

Université Paris Descartes
Ecole Doctorale du Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Présentée par
Catherine NURY

**Développement d'une sonde de photoaffinité pour la détection
sensible de formes actives de Métalloprotéases Matricielles dans
des systèmes biologiques complexes**

Sous la direction de : **Dr. Vincent DIVE**

JURY

Professeur Jean-Baptiste MICHEL
Docteur Jean-Claude FLORENT
Docteur Santiago RIVERA
Docteur Vincent DIVE

Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	5
Introduction	8
<u>Chapitre I. Métalloprotéases Matricielles : généralités.....</u>	<u>10</u>
I. Rôle fonctionnel des MMP	11
II. La métalloélastase à zinc ou MMP-12	16
II. 1. Caractérisation biochimique de la MMP-12	16
II. 2. Rôle de la MMP-12 dans les pathologies pulmonaires.....	17
II. 3. Rôle de la MMP-12 dans le développement de l'athérosclérose.....	20
III. Eléments de structure des MMP.....	22
III. 1. Les MMP, des protéases à plusieurs domaines	22
III. 2. Structure 3D des domaines catalytiques des MMP	27
IV. Inhibiteurs synthétiques de MMP.....	29
<u>Chapitre II. Systèmes de détection des formes actives de MMP.....</u>	<u>31</u>
I. Systèmes de détection utilisant l'activité catalytique des MMP	31
I. 1. Zymographies.....	31
I. 1. a) Zymographie de gélatine.....	32
I. 1. b) Zymographie de caséine.....	33
I. 1. c) Zymographie de collagène	33
I. 1. d) Zymographie d'élastine	34
I. 1. e) Zymographie de transferrine carboxyméthylée.....	34
I. 1. f) Zymographie <i>in situ</i>	35
I. 1. g) Zymographie en temps réel (real time zymography).....	37
I. 2. Substrats naturels protéiques.....	38

I. 2. a)	Substrats protéiques radioactifs	38
I. 2. b)	Gélatine biotinylée	39
I. 2. c)	Substrat protéique succinylé.....	40
I. 2. a)	Substrats protéiques fluorescents.....	41
I. 2. b)	Substrats naturels non modifiés.....	42
I. 3.	Substrats synthétiques fluorescents.....	44
I. 3. a)	Substrats peptidiques commerciaux FRET	44
I. 3. b)	Peptides fluorogéniques de structure en triple hélice	47
I. 3. c)	Substrats peptidiques et détection à l'argent.....	48
I. 4.	Immunocapture et détection des formes actives de MMP.....	49
I. 4. a)	Immunocapture et substrats peptidiques.....	49
I. 4. b)	Test « sandwich »	52
II.	Utilisation d'inhibiteurs de MMP pour détecter les formes actives	54
II. 1.	Essais avec des inhibiteurs covalents.....	54
II. 2.	Utilisation d'inhibiteurs greffés sur un support solide	54
II. 3.	Principe des sondes « Activity Based Probe »	60
II. 4.	Principe du marquage par photoaffinité	64
II. 5.	Application du marquage par photoaffinité pour les MMP	65
II. 5. a)	Groupement benzophénone.....	66
II. 5. b)	Groupement trifluométhylphényldiazirine	71
II. 5. c)	Groupement azoture d'aryle.....	76
II. 5. d)	Bilan des sondes ABP développées dans la littérature pour la détection des formes actives de MMP	78
II. 6.	Travaux antérieurs sur une première génération de sonde ABP	80
III.	Objectifs de la thèse.....	83
	<u>Chapitre III. Résultats et discussion.....</u>	85
I.	Conception et synthèse de la sonde.....	85
I. 1.	Conception de la sonde.....	85
I. 2.	Synthèse de la sonde	86

II.	Photomarquage de MMP recombinantes	88
II. 1.	Affinité de la sonde pour les MMP	88
II. 2.	Modification covalente des MMP recombinantes	89
II. 2. a)	Marquage covalent du site actif des MMP	89
II. 2. b)	Modification d'un panel de MMP recombinantes	90
II. 3.	Sensibilité de détection des MMP	93
II. 4.	Marquage d'un mélange de domaines catalytiques de MMP en tampon et en milieu complexe	94
II. 5.	Etude des mutants de la hMMP-12	96
II. 6.	Conclusion sur le marquage des MMP recombinantes	98
III.	Etude de milieux complexes avec la sonde	100
III. 1.	Caractérisation de la sonde 2 vis-à-vis de la mMMP-12.....	101
III. 2.	Marquage de formes endogènes de la mMMP-12 dans les BAL.....	102
III. 3.	Etude des carotides et aortes humaines	110
IV.	Discussion.....	116
	Conclusion générale.....	121
	<u>Chapitre IV. Matériels et méthodes.....</u>	123
I.	Synthèse chimique de la sonde.....	123
I. 1.	Méthodes d'analyses en chimie.....	123
I. 1. a)	HPLC.....	123
I. 1. b)	ESI	123
I. 1. c)	MALDI-TOF	123
I. 1. d)	RMN.....	124
I. 1. e)	Spectrophotomètre UV-Vis	125
I. 2.	Réactifs chimiques	125
I. 3.	Synthèse du synthon phosphinique.....	125
I. 4.	Synthèse de la sonde radioactive	130

II.	Matériels et méthodes biochimie	138
II. 1.	Matériels et méthodes d'analyse en biochimie.....	138
II. 1. a)	Dosage de Bradford.....	138
II. 1. b)	Radioimageur (β -imager).....	138
II. 1. c)	Fluorimètre.....	139
II. 2.	Enzymes, substrats et tests d'activité enzymatique	139
II. 2. a)	Enzymes.....	139
II. 2. b)	Substrats.....	140
II. 2. c)	Tests d'activité enzymatique.....	140
II. 2. d)	Activation des enzymes.....	141
II. 2. e)	Titration des solutions d'enzyme	143
II. 2. f)	Détermination de la constante d'inhibition des sondes (K_i).....	144
II. 3.	Dispositif de photo-irradiation.....	145
II. 4.	Préparation et photoirradiation des échantillons	146
II. 5.	Gels d'électrophorèse SDS-PAGE.....	147
II. 5. a)	Gels d'électrophorèse monodimensionnels.....	147
II. 5. b)	Gels d'électrophorèse bidimensionnels	149
II. 5. c)	Révélation au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse	150
II. 5. d)	Transfert sur membrane PVDF (PolyVinylideneDiFluoride)	151
II. 5. e)	Révélation en anticorps (Western Blot) des protéines sur les membranes PVDF	152
II. 5. f)	Gels de zymographie de gélatine	153
II. 5. g)	Gels de zymographie de caséine	154
II. 5. h)	Gels de zymographie d'élastine	154
II. 6.	Protocole d'aspiration pharyngique et de lavage bronchoalvéolaire	155
II. 7.	Protocole d'extraction des aortes et carotides	156
	Références bibliographiques.....	157

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	acide aminé
ABP	« activity-based probe »
ABPP	« activity-based probe profiling »
Ac	acétyle
ADAM	« a disintegrin and metalloproteinase »
ADAM-TS	« a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs »
AESF	« 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride »
AF	acide formique
AfBP	« affinity activity-based probe »
APMA	acétate de 4-aminophényle mercure
Apo E	apolipoprotéine-E
APS	persulfate d'ammonium
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAL	lavage bronchoalvéolaire
BODIPY	bore-dipyrométhène
BPCO	bronchopneumopathie chronique obstructive
ClHOBt	6-chloro-1-hydroxybenzotriazole
CCM	chromatographie sur couche mince
DAB	diaminobenzidine
DABCYL	4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoate de succinimidyle
DIC	1,3-diisopropylcarbodiimide
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
Dpa	acide <i>N</i> -3-(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropionique
DPPIII	dipeptidylpeptidase III
ϵ	coefficient d'extinction molaire
EDANS	acide 5-((2-aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ESI	ionisation par électronébulisation
FAAH	« fatty acid amide hydrolase »
FITC	fluorescéine isothiocyanate
Fmoc	« fluorenylmethyloxycarbonyl chloride »
FP	fluorophosphate
FRET	transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GPI	glycosylphosphatidylinositol

HATU	hexafluorophosphate de <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
IC ₅₀	concentration d'inhibiteur conduisant à 50 % d'inhibition
α-HCCA	acide α-cyano-4-hydroxycinnamique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HRP	péroxydase du raifort
IEF	électrofocalisation
k _{cat}	constante de catalyse de l'enzyme pour le substrat
K _i	constante d'inhibition des inhibiteurs
K _m	constante d'affinité du substrat pour l'enzyme
LAP	leucine aminopeptidase
LDL	lipoprotéines de basse densité
LRP	protéine associée aux récepteurs aux lipoprotéines à basse densité
MALDI	désorption-ionisation laser assistée par matrice
Mca	acide 7-méthoxycoumarine-4-acétique
MMP	métalloprotéase matricielle
MCP	« monocyte chemotactic protein »
MT-MMP	métalloprotéase matricielle de type membranaire
NTA	acide nitriloacétique
Nva	norvaline
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PDB	« protein data bank »
PEG	polyéthylèneglycol
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PVDF	polyfluorure de vinylidène
RMN	résonance magnétique nucléaire
R _f	rapport frontal
R _t	temps de rétention
SDS	sodium dodécyl-sulfate
SPR	résonance des plasmons de surface
TA	température ambiante
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyléthylènediamine
TFA	acide trifluoroacétique
TIMP	« tissue inhibitors of MMP »
TIS	triisopropylsilane
TGF-β	« transforming growth factor-β »

TNBSA	acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique
TOF	temps de vol
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
UKCOL	urokinase
VEGF	« vascular endothelial growth factor »
WB	western blot

Introduction

Les progrès récents accomplis sur l'annotation des génomes et de leurs protéomes associés indiquent la répartition de nombreuses protéines en famille et sous famille issues de gènes ancestraux. Ces données impliquent plus que jamais la nécessité de contrôler si possible la sélectivité des dérivés chimiques de synthèse qui sont développés dans les laboratoires de recherche pour interférer avec la fonction de ces protéines. Cet impératif est par ailleurs rendu obligatoire par l'utilisation de plus en plus fréquente de systèmes biologiques intégrés pour tester ces molécules de synthèses, en partant de cellules jusqu'à des modèles animaux de pathologies humaines. Parmi les outils de la chimie biologie qui se sont développés parallèlement à ces progrès, les approches de criblage de familles de protéines sur la base de leur fonctionnalité avec des sondes irréversibles, ne ciblant que les formes actives de ces protéines, permettent dans un contexte *in vivo* d'objectiver quelles sont les cibles d'un ligand chimique et donc de déterminer son profil de sélectivité d'une manière moins biaisée que dans des tests *in vitro* pour lesquels le choix des cibles est souvent dicté par l'expérimentateur.

Les réflexions formulées ci-dessus s'adressent parfaitement à l'étude des protéases, une famille de protéines comportant chez l'homme 570 membres actuellement. Parmi les questions cruciales que pose cette famille de protéases, l'identification de leurs substrats dégradés *in vivo* figure probablement au premier rang de celles-ci. Néanmoins, ces questions renvoient immédiatement à une autre problématique : quel est à un moment donné l'état du « dégradome », cette notion, dans sa version restrictive, désignant l'ensemble des protéases présentes sous formes actives au moment considéré. Pour aborder ces aspects, la présence d'atomes nucléophiles dans le site actif de nombreuses protéases, à sérine et à cystéine, a été exploitée pour développer des sondes capables de détecter l'état fonctionnel de ces protéases (« activity-based probe »), en visant leurs formes actives. Ces sondes ont bénéficié de l'existence de nombreux inhibiteurs irréversibles de ces protéases. Avec des sondes peu sélectives, on peut ainsi accéder à une description de l'état fonctionnel d'un ensemble très large de ces protéases. Malheureusement, dans le cas des protéases à zinc, qui comptent à peu près 192 membres chez l'homme, ces approches sont restées peu performantes, car le site actif de ces protéases ne contient pas d'atomes nucléophiles pouvant être exploités pour développer des inhibiteurs irréversibles. Il a donc fallu recourir à l'utilisation de groupements photoactivables, capables de modifier de façon covalente ces protéases pour dériver des sondes dites « activity-based probe ». La famille des protéases à zinc de la matrice (MMP) a été la plus étudiée dans ce contexte, avec différentes sondes

mais aucune n'a permis à ce jour de détecter de formes actives de MMP à partir d'un système biologique complexe, tel un fluide ou un extrait de tissus.

Notre groupe a depuis quelques années développé ce type de sondes, mais en rencontrant aussi les mêmes limitations. Dans ce travail de thèse nous avons tout d'abord développé une nouvelle sonde pour détecter les MMP, en changeant la nature du groupement photoactivable utilisé dans la première génération de sonde du laboratoire. Cette nouvelle sonde a fait l'objet d'une caractérisation vis-à-vis de sa capacité à modifier de façon covalente un grand nombre de MMP. Puis, pour valider son intérêt, deux systèmes biologiques complexes ont été étudiés afin de détecter la présence de formes actives dans ces systèmes, respectivement, des lavages bronchoalvéolaires de souris en conditions inflammatoires et puis des artères humaines prélevées sur des patients atteints d'athérosclérose.

Les Métalloprotéases Matricielles (MMP) coupent les liaisons peptidiques dans la partie intramoléculaire de leurs substrats et appartiennent donc à la famille des endopeptidases. Au sein de la très grande famille des protéases (presque 570 gènes décrits dans les mammifères) les MMP sont regroupées dans la famille des métalloprotéases. Plus spécifiquement, elles font partie des métalloprotéases dont le domaine catalytique possède un ion zinc dans leur site actif directement impliqué dans la catalyse et elles sont caractérisées au niveau des séquences en acide aminé par la présence d'un motif signature **HEXXH** (H = histidine, E = glutamate, X = acide aminé). Dans cette séquence, deux résidus Histidine sont présents sur une structure secondaire en hélice alpha et pointent en direction de l'ion zinc pour interagir avec celui-ci. Le résidu Glu est, quant à lui, impliqué dans l'acte catalytique, servant de relai comme accepteur/donneur de liaison hydrogène durant l'acte catalytique. Les atomes de zinc impliqués dans un acte catalytique possèdent en général trois ligands fournis par l'enzyme, le quatrième ligand étant une molécule intervenant dans l'hydrolyse du substrat et souvent déplacé par l'interaction du substrat avec le site actif. Selon la famille des protéases à zinc, le troisième ligand peut être de nature variée (Glu, Asp et His), dans le cas des MMP celui-ci est toujours un résidu His. Les données issues des analyses cristallographiques ont permis de montrer que les MMP forment du point de vue structural une sous-famille, « les metzincines », comprenant les serralysines, les astacines, les ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) et les MMP. Cette classification se justifie par la présence dans ces protéases, de domaines catalytiques de 170 résidus à peu près, dont le repliement montre de très fortes analogies structurales et notamment un résidu méthionine situé dans une séquence strictement conservée entre ces protéases, **HEXXHXXGXXH₍₇₎M**. Le travail d'annotation des gènes chez l'homme a permis d'identifier 23 gènes codant pour les MMP, présents sur le chromosome 11.

Les MMP ont été décrites historiquement pour leur capacité à hydrolyser des protéines de la matrice extracellulaire, dont le collagène, avec la découverte de la première MMP présentant la capacité à dégrader le collagène sous sa forme native, la collagénase de type 1 ou MMP-1. Cette activité de dégradation des protéines de la matrice a conduit au terme de « matrixin », en anglais « matrix metalloproteases », pour désigner cette famille de protéases. S'il est effectif que collectivement l'ensemble des MMP est bien capable de dégrader l'ensemble des protéines identifiées à ce jour de la matrice extracellulaire, il est en revanche important de mentionner que cette proposition ne repose que sur des données issues d'expériences réalisées *in vitro*, et elles sont donc à prendre avec précautions. Cette mise en garde s'impose d'autant plus que la plupart des animaux dans lesquels le gène codant pour une MMP a été invalidé montrent des phénotypes tout à fait normaux (à

l'exception de la MMP-14). Contrairement à toute attente, les animaux MMP-14^{-/-} présentent de nombreuses anomalies osseuses, suggérant une forte implication de cette MMP dans le métabolisme normal du collagène, une observation peu attendue, dans la mesure où les études réalisées *in vitro* n'ont pas conduit à présenter cette MMP comme une collagénase majeure. Ces remarques renvoient à une très grande attente dans le domaine des MMP, celui de la détermination de leurs substrats réels *in vivo* dans différentes situations physiopathologiques. Tirant parti des ressources en analyse protéomique, le groupe de C. Overall a notamment pu montrer la capacité des MMP à dégrader un grand nombre de protéines, autres que celles appartenant à la matrice extracellulaire, comme des facteurs de croissance, des cytokines, des chémokines, des récepteurs. Cette multitude de substrats, qui reste à démontrer *in vivo*, peut apparaître étonnante, cependant elle semble cohérente à la proposition que les MMP sont des acteurs majeurs des différents types de remodelage tissulaire essentiels à la mise en place et au maintien de l'organisation de nos cellules dans différents types de tissus.

Outre leur capacité à dégrader des protéines de la matrice extracellulaire, par la suite d'autres critères ont été proposés pour identifier les MMP, notamment leur inhibition par des inhibiteurs protéiques particuliers, les TIMP (tissue inhibitors of matrix metalloproteases) qui sont souvent co-exprimés avec les MMP et donc contrôlent leur activité protéolytique à l'extérieur de la cellule.

I. Rôle fonctionnel des MMP

Le premier membre de la famille des métalloprotéases matricielles (MMP) a été découvert il y a 50 ans par Gross et Lapiere, décrivant une activité protéolytique capable de dégrader le collagène pendant la métamorphose de la queue du têtard.¹ Cette découverte a ouvert la voie à la caractérisation d'une famille comprenant aujourd'hui 23 membres chez l'homme, dont l'étude *in vitro* a conduit à proposer que collectivement les MMP sont capables de dégrader tous les composants protéiques de la matrice extracellulaire, justifiant leur appellation. Les MMP sont des endopeptidases appartenant à la sous famille des metzincines, elle-même issue de la super famille des zincines.² Ces protéases se caractérisent par la présence au sein de leur site actif d'un atome de zinc catalytique directement impliqué dans la réaction d'hydrolyse des substrats protéiques.

Chaque MMP n'a pas une spécificité stricte pour la dégradation d'un substrat particulier, ainsi en plus des collagénases, le collagène *in vitro* peut être dégradé par la MMP-14 et la MMP-9. A cette redondance de fonction s'ajoute la multiplicité des membres

dans une sous-famille, celle des collagénases regroupant 3 membres les MMP-1, MMP-8 et MMP-13 et les gélatinases deux membres les MMP-2 et MMP-9, en notant que la gélatine est aussi dégradée par d'autres MMP. La différence dans le nombre 1, 8 et 13 associé aux collagénases reflète le nombre d'années qui se sont écoulées pour découvrir, qu'en dehors de la MMP-1, il y avait d'autres collagénases au sein de la famille des MMP. On comprend dès lors la difficulté qu'il peut y avoir dans un contexte de très forte redondance à pouvoir conclure sur l'identité de la MMP à cliver tel substrat dans un contexte donné.³ Cette redondance explique aussi pourquoi finalement les résultats obtenus sur les animaux transgéniques n'exprimant pas une MMP particulière ont été assez décevants. Une autre dimension à prendre en compte est la notion que la fonction d'une MMP peut varier d'une espèce à l'autre, ainsi le rôle de la MMP-1 comme collagénase essentielle dans plusieurs espèces semble être rempli par la MMP-13 dans le cas de la souris et du rat.⁴ La MMP-12 de plusieurs espèces est capable de dégrader la gélatine, sauf celle produite par l'homme.⁵ Cette fonction des MMP changeant d'une espèce à l'autre est peut-être à mettre aussi sur le compte du type cellulaire sécrétant la MMP, pouvant changer selon les espèces.

La dégradation des membranes basales dans les tissus par les MMP a incité les chercheurs à considérer les MMP comme des acteurs majeurs des processus inflammatoires, d'angiogenèse et de la progression tumorale.⁶ La Figure 1 donne une illustration des différents contextes pathologiques dans lesquels les MMP ont été le plus étudiées. Dans tous ces exemples, on peut s'interroger sur l'identité du(des) substrat(s) dégradé(s) par les MMP.

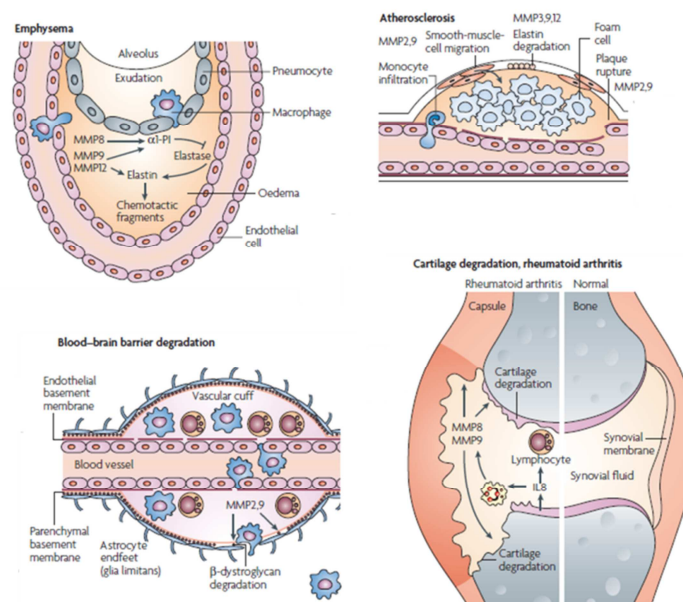


Figure 1 : exemple d'implication des MMP dans différents contextes pathologiques⁷

Les effets de dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP peuvent être difficiles à interpréter, la matrice n'étant pas seulement un support mécanique pour les cellules et une barrière inerte pour définir des tissus. On sait en effet que cette matrice peut servir de réservoir à des protéines importantes pour la messagerie cellulaire. Ainsi, plusieurs MMP semblent participer à la libération du VEGF, facteur de croissance fortement ancré dans la matrice extracellulaire.⁸ La dégradation de cette matrice peut aussi produire des fragments protéiques aux activités multiples, comme l'endostatine⁹ et l'angiostatine qui stimulent l'angiogenèse.¹⁰ Donc au-delà du simple remodelage de la matrice, l'implication des MMP dans un grand nombre de processus biologiques, allant de l'implantation des embryons jusqu'à la mort cellulaire, en passant par les phénomènes cicatrisation, d'ossification et d'immunité peut s'expliquer aussi par la mobilisation de facteurs présents dans la matrice, parallèlement au remodelage tissulaire.^{11,12,13,14}

L'implication des MMP dans la régulation d'un aussi grand nombre de phénomènes a évidemment servi de moteur puissant pour le développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition des MMP par des composés de synthèse.^{15,7,16} Cet axe thérapeutique semblait justifié par l'observation, dans de nombreuses études, d'une association entre la surexpression des MMP et le développement de pathologies humaines, alors qu'à l'état basal chez l'adulte, il n'y a que très peu d'expression de MMP.^{17,18,19} Malheureusement, l'utilisation des inhibiteurs en essais cliniques chez des patients atteints de cancer a abouti à des résultats très décevants.^{20,21,22} *A posteriori* ces résultats peuvent s'expliquer en considérant tout d'abord que les inhibiteurs utilisés étaient très peu sélectifs des MMP, d'où un blocage de l'ensemble des MMP, mais aussi d'autres métalloprotéases à zinc de la famille des ADAM et des ADAM-TS. En outre, la connaissance du rôle réel des MMP *in vivo* dans la progression tumorale était alors extrêmement imparfaite. Enfin, nous savons aujourd'hui que toutes les MMP ne sont pas des cibles thérapeutiques, notamment dans le cancer, certaines faisant parties de la réponse de l'hôte pour contrer l'évolution de la pathologie. Un exemple assez caractéristique est celui de la MMP-8 exprimée par les neutrophiles dans certains cancers. L'absence de la MMP-8 empêche le recrutement de neutrophiles dans la tumeur, affaiblissant la réponse immunitaire. Dans ce cas le rôle de la MMP-8 serait l'activation de chimiokines indispensables pour recruter les neutrophiles.^{23,24,25,26} Par la suite d'autres MMP, les MMP-3, 9, 11, 12, 19, selon les contextes pathologiques, ont été avancées comme des « anticibles » pour des interventions thérapeutiques.^{25,26}

Au cours de ces études, l'implication des MMP comme acteur majeur dans la dégradation de la matrice extracellulaire s'est trouvée remise en question en constatant

dans différents modèles animaux, mais aussi chez des patients, que des traitements aigus et pendant de longues périodes avec des inhibiteurs de MMP, n'avaient aucun effet sur la matrice extracellulaire. On a noté chez les patients essentiellement des douleurs musculo-squelettiques suite au traitement par ces inhibiteurs. Cette absence d'effet sur les tissus peut être mise en relation avec l'absence de changement de phénotype pour la plupart des souris transgéniques dans lequel un gène de MMP a été invalidé, à l'exception de la MMP-14. Dans ces souris, on observe une dérégulation très importante du métabolisme du collagène, aboutissant à une surmortalité des souriceaux, associée à une diminution importante de leur taille et à de nombreuses anomalies au niveau du squelette.^{27,28}

L'ensemble de ces résultats a entraîné un changement de paradigme dans lequel la dégradation des protéines de la matrice par les MMP est aujourd'hui largement reconsidérée, au profit de la recherche de nouveaux substrats de ces protéases, avec l'émergence d'un nouveau champ de recherche le « dégradome des protéases », puis « l'interactome », qui dans ce domaine englobe les substrats et les inhibiteurs des MMP.²⁹ En effet, plus que la protéase, le substrat dégradé par cette protéase dicte la réponse biologique.³⁰ Parmi les études ayant mise en évidence de nouveaux substrats pour les MMP, on peut notamment citer celle sur la MMP-7 démontrant que cette dernière joue un rôle clé dans l'activation des défensines lors d'infection bactérienne.³¹ En utilisant des approches de double hybrides, il a été aussi possible de révéler le rôle de la MMP-2 dans le clivage de la MCP-3, une chimiokine. D'autres études ont également indiqué un rôle important des MMP dans l'immunité acquise en raison de leur capacité à cliver d'autres chimiokines.³²

Dans cette même période des études sur des cellules sur-exprimant une MMP particulière combinées au développement de nouvelles approches de protéomique, notamment par le groupe de CM. Overall, ont permis de découvrir toute une liste de nouveaux substrats des MMP. Dans le cas de la MMP-14, cette approche a permis l'identification de 14 nouveaux substrats de cette MMP, dont seulement deux appartiennent à la matrice extracellulaire.³³ Depuis, la mobilisation de facteurs de croissance par les MMP est considéré comme une activité au cœur des nombreux rôles de ces MMP. Dans ce cas, les MMP interviennent non pas en clivant les facteurs de croissance, mais plutôt leurs protéines transporteuses, permettant ainsi leur libération pour aller interagir avec leurs récepteurs.³⁴ L'activation par de nombreuses MMP de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α et IL-1 β a aussi été reportée. Cependant l'ensemble de ces travaux concernant des études *in vitro* et nécessitera d'être validé dans des modèles animaux.^{35,36}

A cette complexité de la fonction exacte des MMP, variant selon les contextes physiopathologiques, s'ajoute aujourd'hui la notion de « web des protéases ». En effet, les MMP ne fonctionnent pas isolément, mais probablement dans un réseau de protéases, dont 570 seraient exprimées chez l'homme,³⁷ chaque protéase accomplissant un acte définitif sans retour.²⁹ Le niveau d'intégration des MMP dans ces réseaux de protéases est illustré dans une étude utilisant un inhibiteur de MMP, le Prinomastat. Les auteurs montrent en s'appuyant sur des techniques de protéomique que l'effet de l'inhibiteur entraîne la dérégulation de trente-sept protéases et de dix inhibiteurs protéiques.³⁸ Dans un modèle de métastases chez l'animal, cette interrelation entre protéases peut expliquer pourquoi l'utilisation d'inhibiteur de MMP comme le TIMP-1 n'engendre pas une diminution de la dissémination des cellules cancéreuses comme attendu, mais à l'inverse l'activation de voies de signalisation non anticipées et une augmentation des métastases.³⁹

Tous ces travaux aboutissent finalement sur la notion que les MMP doivent être considérées comme des molécules capables d'activer/désactiver des voies de signalisation multiples et donc d'agir sur les décisions de la cellule. Aujourd'hui les MMP ne peuvent plus être considérées seulement comme de simples ciseaux moléculaires dont la fonction serait essentiellement tournée vers les protéines de la matrice extracellulaire, mais comme des acteurs à part entière des voies de signalisation. Les différents niveaux post-traductionnels contrôlant l'activation et l'activité des MMP prennent un sens particulier dans ce contexte, qui suggère que les MMP doivent agir à un moment précis, au bon endroit, en contact éventuellement de leur substrat, et de façon limitée dans le temps. Les MMP sont à cet égard pour une part sécrétées sous forme d'une proenzyme, nécessitant un clivage par une autre protéase pour les activer ; pour une autre part directement activées dans la voie de sécrétion pour les furines. Une fois activées, l'activité protéolytique des MMP est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques protéiques les TIMP ou bien des inhibiteurs protéiques non spécifiques comme l' α -macroglobuline. Enfin, une connaissance précise des substrats dégradés par ces protéases *in vivo* reste un objectif essentiel à réaliser dans les années à venir.

Nous ne reviendrons pas dans le détail sur les différents contextes pathologiques dans lesquels les MMP sont considérées comme jouant un rôle important, plusieurs revues étant aujourd'hui disponibles notamment dans les maladies du système nerveux central,¹⁷ pulmonaires,⁴⁰ et de la progression tumorale.⁴¹ Nous allons en revanche nous focaliser sur la métalloélastase à zinc du macrophage ou MMP-12, ainsi que sur son implication dans divers processus pathologiques, notamment l'inflammation du poumon et l'athérosclérose.

II. La métalloélastase à zinc ou MMP-12

II. 1. Caractérisation biochimique de la MMP-12

Dès 1975, le groupe de Z. Werb fut le premier à signaler la présence dans le milieu de culture de macrophages murins activés par du thioglycolate, d'activités protéolytiques capables de dégrader de l'élastine sous forme insoluble.⁴² Quelques années plus tard et après plusieurs étapes de purification, ce même groupe reportait que cette activité élastase avait les caractéristiques d'une activité de type métalloprotéase à zinc, montrant notamment sa dépendance à l'EDTA et plus particulièrement une dépendance au TIMP-1, inhibiteur spécifique des MMP, mais possédant un poids moléculaire de 22 kDa seulement (Figure 2).⁴³

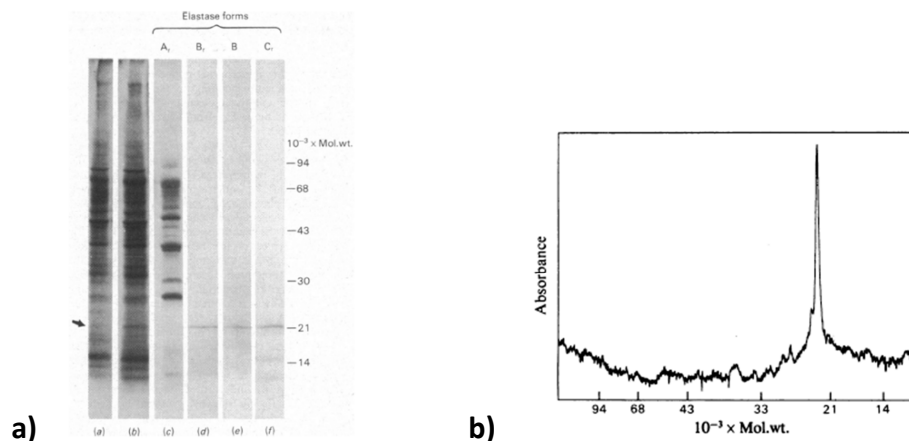


Figure 2 : a) premier gel SDS-PAGE de la MMP-12 montrant la purification de la MMP-12 reportée par la groupe de Z. Werb b) scan du gel en densitométrie avec la MMP-12 de poids moléculaire 22 kDa⁴³

En 1992 reprenant le principe de ces études mais cette fois sur des macrophages humains, le groupe de S. Shapiro a pu isoler un cDNA à partir d'une banque murine codant pour une protéine de poids moléculaire de 54 kDa, présentant toutes les caractéristiques des MMP : a) un prodomaine, b) un domaine catalytique possédant la séquence signature **HEXXHXXGXXH** et c) un domaine hémopexine (voir plus loin).⁴⁴ Cette étude a notamment montré que si l'on exprime cette MMP-12 dans *E. Coli*, on peut observer 1) avant renaturation de la protéine, une bande vers 54 kDa et 2) après renaturation, une seule bande visible se situant vers 22 kDa, ces résultats allant dans le sens des données précédemment observées par Z. Werb.

Le même travail effectué par le groupe de S. Shapiro à partir de macrophages humains a permis de montrer la présence d'une MMP-12, possédant les mêmes caractéristiques, mais avec seulement 64 % d'identité de séquence entre les formes murine et humaine, ce qui apparaît assez faible comme identité de séquence, comparé à ce qui est

observé pour les autres MMP. Par exemple, les hMMP-2 et hMMP-9 possèdent des pourcentages d'identité de séquence aux alentours de 95 % entre formes murine et humaine. De même, les pourcentages d'identité entre la MMP-12 et les autres MMP varient entre 33 % et 49 %, ce qui est, là encore, un pourcentage assez bas, suggérant des propriétés particulières pour la MMP-12. En revanche, la localisation sur le chromosome humain 11q22 de la séquence codant pour la MMP-12 reste partagée avec de nombreuses autres MMP. Par la suite, des études sur les propriétés de la MMP-12 humaine (forme recombinante) et notamment sur sa capacité à dégrader des substrats de la matrice extracellulaire ont été réalisées. Ces études ont ainsi montré qu'en dehors de l'élastine, d'autres substrats tels que la fibronectine, la laminine, l'entactine, le collagène de type IV entre autres sont bien clivés par la MMP-12. Par contre le collagène interstitiel (type I, II et III) n'est absolument pas clivé par cette protéase. Par ailleurs, l' α -antitrypsine est également très bien clivée par la MMP-12, ce qui constitue un résultat très intéressant, car cette protéine inhibe une autre activité élastase à sérine : la leucocyte élastase, exprimée aussi en condition inflammatoire. Cette dernière propriété suggère donc un rôle de potentialisation de la MMP-12 dans la dégradation de l'élastine en conditions pathologiques.⁴⁵

II. 2. Rôle de la MMP-12 dans les pathologies pulmonaires

La première lignée de souris transgénique n'exprimant pas la MMP-12 a été reportée par le groupe S. Shapiro. Comme d'autres MMP, les souris MMP-12^{-/-} n'ont pas de phénotype particulier, si ce n'est la mort d'un certain nombre de souriceaux avant la mise à bas, un effet pouvant être mis en relation avec la forte expression de la MMP-12 dans le placenta humain.⁴⁶ Une des propriétés la plus surprenante de la MMP-12 que l'on peut déduire à partir de ces souris transgéniques, est l'incapacité des macrophages n'exprimant pas la MMP-12 à traverser des membranes basales reconstituées *in vitro*. Cette observation est cohérente avec des études *in vivo*. En effet, si l'on implante en *intrapéritonéal* des éponges contenant du matrigel à des souris, on observe dans le cas des souris MMP-12^{-/-} une incapacité des macrophages à migrer vers ces éponges, à l'inverse de ce qui est observé chez les animaux contrôles. Ceci indique que la MMP-12 est essentielle pour que les macrophages puissent envahir un tissu.⁴⁷ Ce résultat est important et constitue un cas assez unique chez les MMP puisqu'il ne semble pas y avoir de redondance, la MMP-12 paraissant seule responsable de la capacité du macrophage à envahir un tissu. Il faut aussi noter le fait que les monocytes n'expriment pas la MMP-12. Ce n'est en effet qu'au cours de la différenciation de ces derniers en macrophages qu'apparaît l'expression de MMP-12, ainsi que celle d'autres MMP. Cette expression de MMP est également accompagnée de la perte d'activité protéases à sérine par ce sous-type cellulaire. Ceci explique pourquoi les

monocytes migrent normalement dans les souris $MMP-12^{-/-}$, cette migration mobilisant d'autres activités protéolytiques.

La perte du domaine hémapexine lors de l'activation de la MMP-12 est restée très longtemps une observation assez intrigante. Un début d'explication a pu cependant être apporté par une étude récente du groupe de S. Shapiro. Cette étude attribue en effet une activité antimicrobienne au seul domaine hémapexine de la MMP-12. Les souris $MMP-12^{-/-}$ infectées par des pathogènes bactériens meurent beaucoup plus que les souris contrôles. Par ailleurs, pendant qu'une clairance marquée des bactéries peut être observée dans ces dernières, pour les souris $MMP-12^{-/-}$, on observe une forte persistance de bactéries dans les macrophages pulmonaires (Figure 3b).

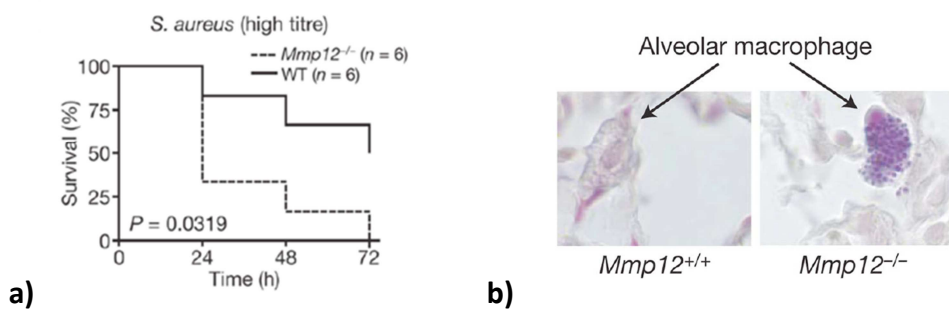


Figure 3 : a) les souris $MMP12^{-/-}$ ont une moindre survie par rapport aux contrôles après une infection bactérienne b) forte accumulation des pathogènes dans les poumons des souris $MMP12^{-/-}$ par rapport aux contrôles⁴⁸

De façon intéressante, la présence d'un domaine catalytique fonctionnel n'est pas nécessaire pour permettre aux animaux contrôles de se débarrasser du pathogène, car seul le domaine hémapexine suffit pour observer cet effet. L'analyse des séquences de domaines hémapexines révèle que celui de la MMP-12 possède une séquence signature KDDK/KDEK, séquence qui, suivant l'espèce qui est unique au sein de la famille des MMP (Figure 4a). Cette séquence se trouve à l'extrémité d'une boucle, donc accessible pour des interactions intermoléculaires. Le peptide KDDK montre lui-même une activité antimicrobienne, confirmant le rôle de cette séquence dans la fonction antibactérienne du domaine hémapexine de la MMP-12. La lyse des bactéries par le domaine hémapexine de cette protéase a lieu dans le macrophage et mobilise la forme inactive de la MMP-12.⁴⁸

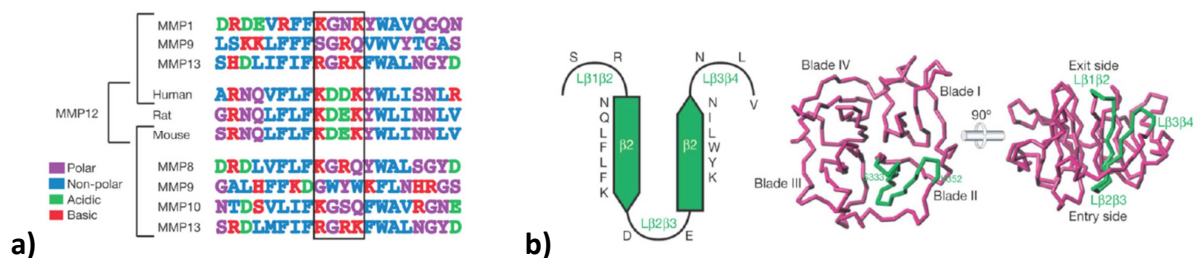


Figure 4 : a) analyse des séquences d'un segment du domaine hémapexine dans les MMP indiquant la présence de la séquence KDDK/KDEK uniquement dans la MMP-12 b) la séquence KDDK/KDEK est observée dans une boucle accessible sur le domaine hémapexine⁴⁸

L'expression de la MMP-12 dans les macrophages pulmonaires et la sécrétion de cette enzyme capable de digérer l'élastine sous conditions inflammatoires, ont conduit le groupe de S. Shapiro à déterminer le rôle joué par cette protéase dans l'emphysème pulmonaire. Cette pathologie se caractérise par une destruction de l'élastine avec un élargissement des alvéoles pulmonaires, entraînant une dysfonction de la respiration (Figure 5).

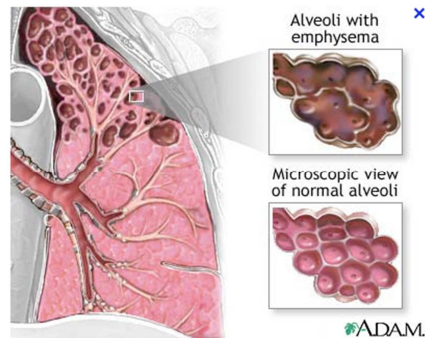


Figure 5 : schéma indiquant l'élargissement des alvéoles pulmonaires dans la BPCO ⁴⁹

Chez la souris, le rôle majeur de la MMP-12 dans le développement de l'emphysème a été démontré. En effet, de façon remarquable et par rapport aux contrôles, les souris MMP-12^{-/-}, après une exposition à la cigarette, n'ont pas d'augmentation de macrophages dans les poumons et ne développent pas d'emphysème, confirmant le rôle majeur et unique de la MMP-12 dans la migration des macrophages et dans le développement de l'emphysème.⁴⁷ Ces données obtenues à partir de modèles murins sont évidemment à considérer avec prudence. On peut en effet s'interroger sur 1) la capacité de ces modèles à reproduire la pathologie humaine et 2) sur le rôle exact de la MMP-12 murine dans ce contexte pathologique et d'une divergence possible avec celui de la MMP-12 humaine compte tenu de leur divergence de séquence. Une étude récente suggère une association possible entre le polymorphisme du gène de la MMP-12 et les différences de mesure de la fonction respiratoire chez 8300 patients. Cette étude démontre en effet que des patients (des enfants atteints d'asthme ou bien des fumeurs atteints de BPCO) homozygotes (AA) pour une mutation (G->A) dans le promoteur du gène de la MMP-12 ont de moins bonnes fonctions respiratoires que les sujets normaux. Cette mutation implique une augmentation de l'activité du promoteur de la MMP-12, suggérant un lien entre l'évolution de ces pathologies et le taux d'expression de la MMP-12.⁵⁰ Suite à cet article, plusieurs études ont été publiées dans lesquelles les auteurs ont essayé de mettre en relation la quantité de MMP-12 sous forme active et la fonction pulmonaire des patients. Les résultats de ces études ne sont pas toujours très concordants, probablement en relation avec la technique utilisée pour calibrer la quantité de MMP-12 sous forme active, un objectif qui n'est pas simple à régler compte tenu des quantités très faibles de MMP-12 sous cette forme. Une des

dernières études sur le sujet conclue à l'existence d'une relation entre sévérité de la pathologie des patients BPCO et le taux d'expression de la MMP-12 sous forme active, suggérant une utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la MMP-12 pour traiter ces patients.⁵¹ Le rôle de la MMP-12 dans le développement de l'emphysème chez la souris a été confirmé par l'étude d'animaux déficients en récepteur $\alpha 6\beta 6$, récepteur dont une des fonctions est d'activer le TGF- β qui est un régulateur négatif de l'expression de la MMP-12. Ces souris transgéniques $\alpha 6\beta 6^{-/-}$ développent un emphysème associé à une forte surexpression de MMP-12.⁵²

II. 3. Rôle de la MMP-12 dans le développement de l'athérosclérose

Une des atteintes les plus complexes mais courante des artères est liée à l'athérosclérose dont l'élément déclenchant serait un dépôt de LDL s'oxydant et initiant un recrutement de monocytes qui vont se transformer en macrophages, capables de se charger de LDL oxydé pour devenir des macrophages spumeux. Ces éléments finiront par former une plaque d'athérosclérose qui si elle se fragilise pourra entraîner selon le lit vasculaire un infarctus du myocarde.⁵³ Quatre arguments sont invoqués pour impliquer les MMP dans ce processus pathologique :

- a) au niveau de l'une plaque en formation, les changements observés passent par un remodelage tissulaire facilitant la migration de certaines cellules, comme les macrophages et les cellules musculaires lisses. Les dépôts de matrice et la mobilisation de facteurs de croissance constatés dans les plaques évoquent un rôle des MMP.
- b) la rupture de la plaque résulte d'une dégradation de la matrice constitutive de l'artère attribuée à une activité protéolytique ciblant des protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène de type IV et l'élastine, donc des substrats des MMP.
- c) les remodelages constatés ont lieu à des pH physiologiques, assurant une activité maximale pour les MMP.
- d) les MMP sont capables de cliver quasiment tous les constituants protéiques présents dans une plaque en formation.

Plusieurs travaux et revues ont été publiés pour commenter le rôle des MMP dans la progression de plaques d'athérosclérose et leur rupture.^{54,55,56,57} Dans ce qui suit nous nous contentons de résumer les données publiées sur le rôle de la MMP-12 dans cette pathologie.

La MMP-12 pourrait avoir plusieurs substrats ayant leur importance dans cette pathologie, comme l'activation du TNF- α stimulant le recrutement des macrophages ou modulant la chimiokine MCP-1. Plusieurs facteurs de croissance peuvent être libérés de la matrice extracellulaire par la MMP-12, tels que le « fibroblast growth factor-2 », le

« transforming growth factor- β », et le « vascular endothelial growth factor ».⁵⁸ Par ailleurs, une activité élastolytique est observée au niveau de la plaque, l'élastine étant un des substrats préférés de la MMP-12.

A partir de modèles animaux, on constate chez les souris doublement transgéniques MMP-12^{-/-}, Apo E^{-/-} que ces animaux ont des plaques présentant des phénotypes plus stables que les animaux contrôles. Par ailleurs, peut-être plus surprenant, une diminution dans la croissance des plaques d'athérosclérose a été reportée chez ces animaux par le groupe de J. Johnson.⁵⁹ Etonnant, car cette observation suppose que la MMP-12 dans ce contexte participe à l'élaboration de la plaque, loin d'une vision de destruction du tissu entraînant la rupture de la plaque. Ceci suggère que le rôle de la MMP-12 pourrait changer au cours de la progression de la pathologie. Cette remarque est à associer au rôle d'autres protéases, dont il est difficile de prévoir quelle sera exactement la réponse finale enclenchée. De façon intéressante, il est aussi reporté que dans les souris MMP-3^{-/-}, Apo E^{-/-} ou MMP-9^{-/-}, Apo E^{-/-}, on observe l'inverse, avec des plaques progressant cette fois-ci plus vite que dans les animaux contrôles. Ces résultats indiquent donc que les différentes MMP ne jouent pas le même rôle dans cette pathologie, et que certaines MMP comme la MMP-12 semblent être des cibles thérapeutiques pour freiner la croissance des plaques, mais que d'autres MMP comme la MMP-3 et la MMP-9 sont des « anticibles ». Les phénotypes des souris MMP-12^{-/-}, Apo E^{-/-} ayant des plaques formées ont pu être observés suite à l'infusion pendant quatre semaines du RXP470.1, inhibiteur sélectif de la MMP-12. On constate effectivement que l'effet de l'inhibiteur à partir du traitement bloque totalement la croissance de la plaque et génère un phénotype de plaque plus stable que dans les animaux contrôles (Figure 6).

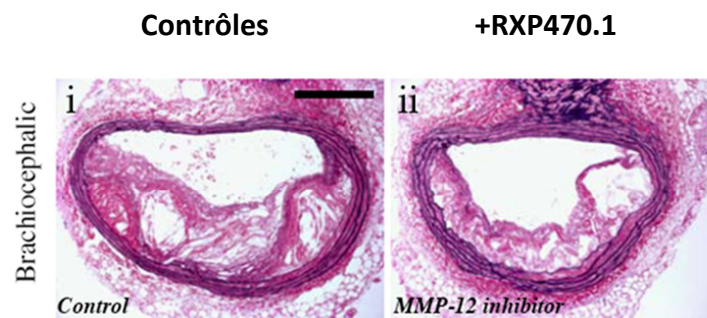


Figure 6 : effet du traitement par le RXP470.1 dans des souris Apo E^{-/-} sur la croissance des plaques d'athérome, celle-ci est bloquée dans les souris traitées par rapport aux contrôles

Une autre étude chez le lapin confirme le rôle de la MMP-12 dans la croissance des plaques, où cette fois la surexpression de la forme humaine de la MMP-12 chez un lapin transgénique stimule effectivement la croissance des plaques.⁶⁰ Dans ces modèles animaux, il est suggéré qu'un des rôles principaux de la MMP-12 serait d'assurer le recrutement des macrophages dans la plaque et de faciliter la migration des cellules musculaires lisses et leur

prolifération. Cependant, la nature des substrats mis en jeu reste là encore à déterminer dans ces études. Si l'expression de la MMP-12 est reconnue pour les macrophages, par contre son expression par des cellules musculaires lisses reste plus controversée. Cependant, dans ce modèle, seule la MMP-12 produite par le macrophage pourrait suffire à assurer la migration des cellules musculaires lisses. On sait par exemple que dans beaucoup de tumeurs, on observe à la surface des cellules tumorales des MMP, non pas produites par ces cellules, mais par des fibroblastes entourant les cellules cancéreuses, ce qui suggère l'existence de « récepteurs » à la surface des cellules permettant d'immobiliser les MMP et donc des actions à distance entre cellules relayées par les MMP.

Chez l'homme l'existence d'une relation univoque entre expression de MMP-12 et un effet causal sur le développement de l'athérosclérose reste à établir. Cependant, la présence de MMP-12 a pu être reliée à l'avancement de la pathologie⁶¹ et au phénotype instable des plaques⁶². Une étude entre une mutation dans le promoteur du gène de la MMP-12 et la diminution du diamètre de l'artère après une angioplastie par pose de « stent » chez des patients diabétiques semble suggérer aussi une relation entre l'expression de la MMP-12 et le remodelage vasculaire.⁶³ Il faudra peut-être attendre la mise au point d'agents de contraste à base d'inhibiteurs de MMP et de MMP-12 en particulier pour faire progresser encore nos connaissances dans ce domaine. Aujourd'hui ces agents d'imagerie sont étudiés chez l'animal, le lapin ou la souris, et toutes les études précliniques devront être réalisées chez ces animaux avant de pouvoir progresser en étude clinique chez l'homme.^{64,65,66,67}

III. Eléments de structure des MMP

III. 1. Les MMP, des protéases à plusieurs domaines

Les gènes des différentes MMP codent pour des chaînes peptidiques de longueur très variable avec des poids moléculaires variant pour les formes les plus petites de 20 kDa à plus de 90 kDa. Ces différences permettent de générer des protéines présentant différents types de domaines autonomes du point de vue structural, un élément ayant permis par un jeu de duplication/fusion de gènes ancestraux de faire émerger à partir d'un même domaine catalytique des protéases ayant des substrats très différents et des régulations différenciées (Figure 7).

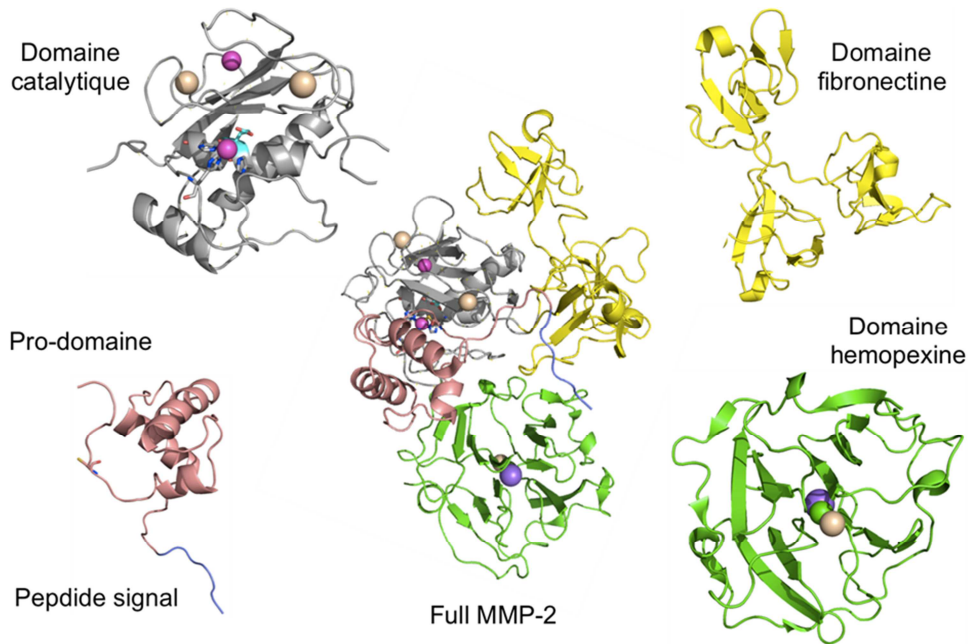
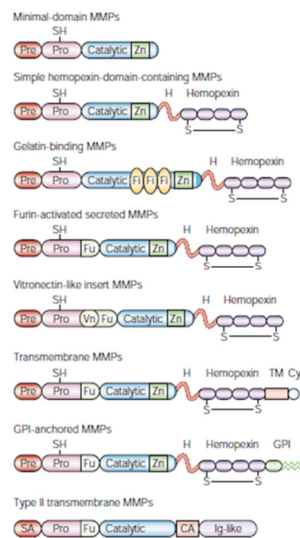


Figure 7 : schéma représentant tous les domaines protéiques observés dans les différentes MMP

Les MMP partagent entre elles une structure minimale se composant de trois domaines : un peptide signal (en bleu), un prodomaine (en marron) et un domaine catalytique (en gris). Elles se distinguent ensuite par la présence ou non dans leur structure de domaines additionnels comme a) un domaine C-terminal de type hémopexine (en vert), identique dans la plupart des MMP et connecté par une région charnière au domaine catalytique, b) un domaine de type fibronectine (en jaune) inséré dans la séquence du domaine catalytique et caractéristique des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) et enfin c) un domaine transmembranaire permettant à certaines MMP d'être présentes à la surface des cellules ancrées à la membrane. Dans le cas des MMP-17 et MMP-25, le domaine transmembranaire est remplacé par un domaine glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ces éléments engendrent cinq types de MMP, selon la présence d'un domaine catalytique seul (MMP-7, MMP-26), du domaine catalytique associé au domaine hémopexine (de nombreuses MMP), de l'addition à ces éléments d'un segment transmembranaire donnant la sous famille des MT-MMP et de la présence des domaines type fibronectine (MMP-2 et MMP-9). Comme le montre la Figure 8, d'autres éléments ont été incorporés, comme la présence d'une séquence déterminant le mode d'activation des MMP, pour générer plus ou moins arbitrairement un classement des MMP en 8 sous-groupes (Figure 8).



MMP designation [*]	Structural class	Common name(s)
MMP-1	Simple hemopexin domain	Collagenase-1, interstitial collagenase, fibroblast collagenase, tissue collagenase
MMP-2	Gelatin-binding	Gelatinase A, 72-kDa gelatinase, 72-kDa type IV collagenase, neutrophil gelatinase
MMP-3	Simple hemopexin domain	Stromelysin-1, transin-1, proteoglycanase, procollagenase-activating protein
MMP-7	Minimal domain	Matrilysin, matrin, PUMP1, small uterine metalloproteinase
MMP-8	Simple hemopexin domain	Collagenase-2, neutrophil collagenase, PMN collagenase, granulocyte collagenase
MMP-9	Gelatin-binding	Gelatinase B, 92-kDa gelatinase, 92-kDa type IV collagenase
MMP-10	Simple hemopexin domain	Stromelysin-2, transin-2
MMP-11	Furin-activated and secreted	Stromelysin-3
MMP-12	Simple hemopexin domain	Metalloelastase, macrophage elastase, macrophage metalloelastase
MMP-13	Simple hemopexin domain	Collagenase-3
MMP-14	Transmembrane	MT1-MMP, MT-MMP1
MMP-15	Transmembrane	MT2-MMP, MT-MMP2
MMP-16	Transmembrane	MT3-MMP, MT-MMP3
MMP-17	GPI-linked	MT4-MMP, MT-MMP4
MMP-18	Simple hemopexin domain	Collagenase-4 (<i>Xenopus</i> ; no human homologue known)
MMP-19	Simple hemopexin domain	RASI-1, MMP-18 ¹
MMP-20	Simple hemopexin domain	Enamelysin
MMP-21 ⁵	Vitronectin-like insert	Homologue of <i>Xenopus</i> XMMP
MMP-22	Simple hemopexin domain	CMMP (chicken; no human homologue known)
MMP-23	Type II transmembrane ¹	Cysteine array MMP (CA-MMP), femalysin, MIFR, MMP-21/MMP-22 ¹
MMP-24	Transmembrane	MT5-MMP, MT-MMP5
MMP-25	GPI-linked	MT6-MMP, MT-MMP6, leukolysin
MMP-26	Minimal domain	Endometase, matrilysin-2
MMP-27 ⁹	Simple hemopexin domain	
MMP-28	Furin-activated and secreted	Epilysin

Figure 8 : classification des MMP en huit sous-groupes distincts¹³

Le peptide signal composé d'environ 20 acides aminés permet la sécrétion de la MMP depuis le milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Il est éliminé dans le réticulum endoplasmique pendant la sécrétion de la MMP.

Le prodomaine se compose d'environ 80 acides aminés et contient la séquence consensus PRCG(V/N)PD comprenant une cystéine, dont l'atome de soufre est en interaction avec l'ion zinc catalytique dans la forme inactive des MMP(Figure 9).⁶⁸

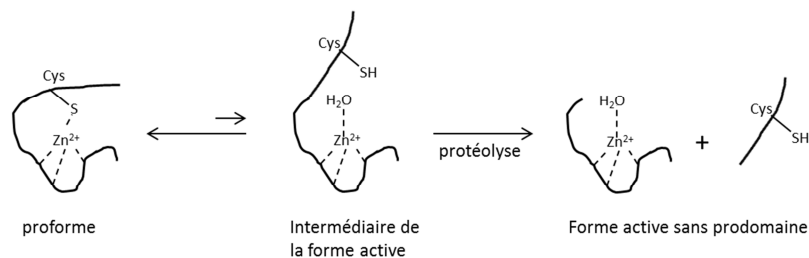


Figure 9 : étapes conduisant au clivage du prodomaine des MMP par déplacement de la cystéine de son interaction avec l'ion zinc⁶⁸

Cette interaction du résidu cystéine conduit au déplacement d'une molécule d'eau essentielle à la catalyse, inhibant donc l'activité catalytique. En outre, le positionnement du prodomaine au niveau du site actif rend celui-ci inaccessible à tout type de substrat. L'activation des MMP nécessite donc l'éloignement du prodomaine du site actif pour rendre celui-ci fonctionnel et permettre l'accessibilité des substrats. Une première étape d'activation consiste à libérer l'ion zinc du site actif de son interaction avec la cystéine, par protéolyse du prodomaine en plusieurs points de clivage, aboutissant à déstabiliser

l'ensemble de l'interaction « prodomaine/site actif »⁶⁹ ou bien par oxydation du résidu cystéine par des petites molécules endogènes, déstabilisant aussi l'interaction « prodomaine/site actif » et pouvant être suivie d'une dégradation de celui-ci par des protéases.

Selon le contexte tissulaire et le type de cellules impliquées, l'activation des MMP fait intervenir différentes activités protéolytiques. La détermination de l'identité des protéases responsables de cette activation est rendue difficile en raison de la présence de plusieurs autres protéases pouvant s'exprimer au même moment et dans le même contexte tissulaire. Ces composantes spatiales et temporelles sont probablement des paramètres essentiels associés au contrôle de l'activité coordonnée des MMP. La plasmine est capable d'activer *in vitro* les proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-9, proMMP-10 et proMMP-13. Les proMMP-11, proMMP-27 et proMT-MMP sont activées par la furine qui reconnaît la séquence RX(K/R)R au niveau du prodomaine. Ces protéases sont activées au niveau intracellulaire et sont sécrétées sous forme active hors de la cellule.

De façon surprenante, c'est l'action concertée entre la MMP-14 et le TIMP-2, un inhibiteur naturel de MMP, qui permet l'activation de la proMMP-2 (Figure 10).

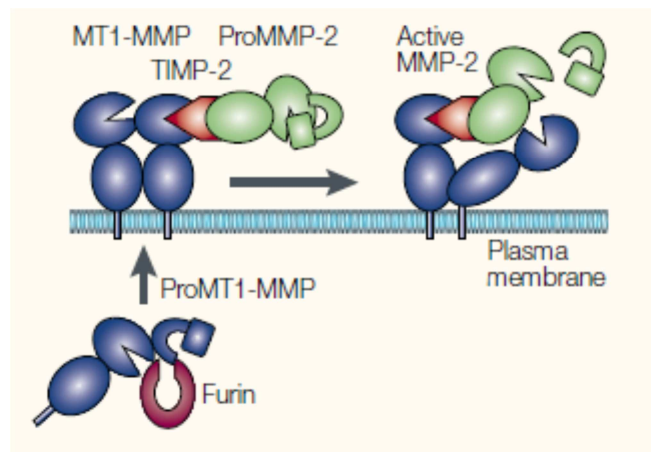


Figure 10 : schéma résumant les étapes proposées pour l'activation de la MMP-2 faisant intervenir la MMP-14 et le TIMP-2⁷⁰

Le scénario envisagé est le suivant. La MMP-14 serait d'abord activée de façon intracellulaire puis sécrétée à la surface des cellules sous forme active. Elle formerait ensuite un complexe ternaire avec une proMMP-2 et le TIMP-2, la partie N-terminale du TIMP-2 interagit avec le site actif de la MMP-14 et sa partie C-terminale avec le domaine hémopexine de la proMMP-2 pour former un complexe ternaire. Ce complexe ternaire contrôlerait la présentation du prodomaine de la MMP-2 à une autre MMP-14, qui finalement aboutirait à l'activation de la MMP-2. Dans ce mécanisme, les concentrations locales de TIMP-2 sont déterminantes et doivent faire l'objet d'une régulation extrêmement fine. Un excès de TIMP-2 entraîne en effet une inhibition complète de toutes formes actives

de MMP-14, inhibant ainsi l'activation de la MMP-2. Mais à l'inverse la présence d'une petite quantité de TIMP-2 est essentielle pour activer la MMP-2. On notera également que les proMMP peuvent être activées *in vitro* de façon chimique par des composées mercuriques comme l'APMA, des réactifs soufrés, ou des agents chaotropiques (SDS).

Le mécanisme d'hydrolyse du substrat par les MMP, communément admis pour la plupart des protéases à zinc, utilise la présence d'une molécule d'eau activée à la fois par l'ion zinc et la chaîne latérale du glutamate présent dans la séquence HEXXH. Le substrat se positionne dans le site actif de façon à ce que le groupe carbonyle de la liaison peptidique clivée interagisse avec l'ion zinc, interaction aboutissant à polariser le groupe carbonyle (Figure 11).⁷¹ Parallèlement, la molécule d'eau interagissant avec l'ion zinc est légèrement déplacée dans une position où son interaction simultanée avec l'ion zinc et le glutamate favorise l'attaque nucléophile du C α du carbonyle du substrat par un OH⁻ provenant de la molécule d'eau, tandis que le carboxylate de la chaîne latérale du glutamate récupère le proton formé. Cette attaque par la molécule d'eau aboutit à la formation d'un intermédiaire tétraédrique d'hybridation sp³ au niveau du C α carbonyle, suivi du transfert d'un proton venant du groupement acide carboxylique vers l'atome d'azote de la liaison peptidique. Cet intermédiaire instable entraîne la rupture de la liaison C-N pour former les deux produits de la réaction d'hydrolyse, avec production d'un côté d'un groupement carboxylate et de l'autre d'une fonction amine. (Figure 11).

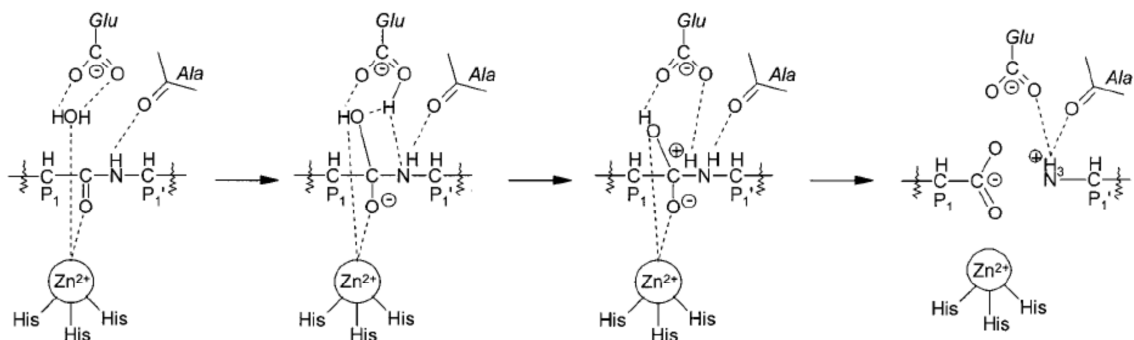


Figure 11 : schéma du clivage d'un substrat par la MMP-8⁷¹

Hormis les matrilysines et la MMP-23, toutes les MMP contiennent un domaine hémopexine d'environ 200 résidus. Ce domaine intervient dans la spécificité de fixation du substrat, mais aussi lors des interactions avec les TIMP, les inhibiteurs physiologiques des MMP. Dans le cas des collagénases, ce domaine est essentiel au clivage du collagène natif. Il est en effet proposé que ce domaine ait pour fonction de déstabiliser la triple-hélice de collagène, déstabilisation nécessaire pour les étapes ultérieures d'hydrolyse.⁷² Comme nous l'avons déjà signalé, dans le cas de la MMP-12 le domaine hémopexine seul possède une activité antimicrobienne grâce à des éléments de séquence très particuliers.

Le domaine charnière est situé entre le domaine catalytique et le domaine hémopexine et sa longueur varie selon les MMP. Cette variation peut avoir un effet non négligeable sur les mobilités relatives de ces deux domaines et leur orientation respective lors de l'interaction avec un substrat, modulant ainsi la spécificité des MMP pour leurs substrats.⁷³

III. 2. Structure 3D des domaines catalytiques des MMP

La résolution de la première structure cristallographique de MMP a été reportée par une équipe du groupe Merck, illustrant une forte implication du monde pharmaceutique dans le domaine des MMP à cette époque, implication motivée par la possibilité d'exploiter ces données structurales pour concevoir des inhibiteurs à des fins thérapeutiques (MMP-1).⁷⁴ Depuis, plus de 100 structures de domaines catalytiques de MMP en complexe avec des inhibiteurs synthétiques ont été déposées dans la PDB.

Le domaine catalytique des MMP se compose de 200 résidus et comporte 2 atomes de zinc et 3 atomes de calcium. Les trois atomes de calcium, ainsi qu'un des atomes de zinc, sont impliqués dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle de ce petit domaine protéique ne possédant pas de ponts disulfures. L'autre atome de zinc est situé dans le site actif de ces protéases. La structure tridimensionnelle est constituée de 5 feuillets β et de trois hélices, connectés par différentes boucles. Le site actif des MMP se caractérise par la présence d'une gorge peu profonde traversant d'ouest en est le corps de la protéine (nomenclature W. Bode²), dont le centre est occupé par un ion zinc (2^+) (zinc catalytique en magenta, Figure 12a) en interaction avec trois histidines en bleu foncé. On remarque sur la Figure 12 la présence du glutamate situé juste au-dessus de l'ion zinc, résidu impliqué dans la catalyse. Cette cavité horizontale permet d'accueillir un fragment peptidique d'au moins six résidus et se trouve complétée par un sous-site de spécificité appelé cavité S_1' . Cette cavité est un canal hydrophobe très profond traversant la protéine de part en part et qui est ouvert au solvant des deux côtés de la cavité (Figure 12). La paroi extérieure de cette cavité hydrophobe est définie par une boucle S_1' (en rouge, Figure 12), appelée aussi boucle de spécificité.

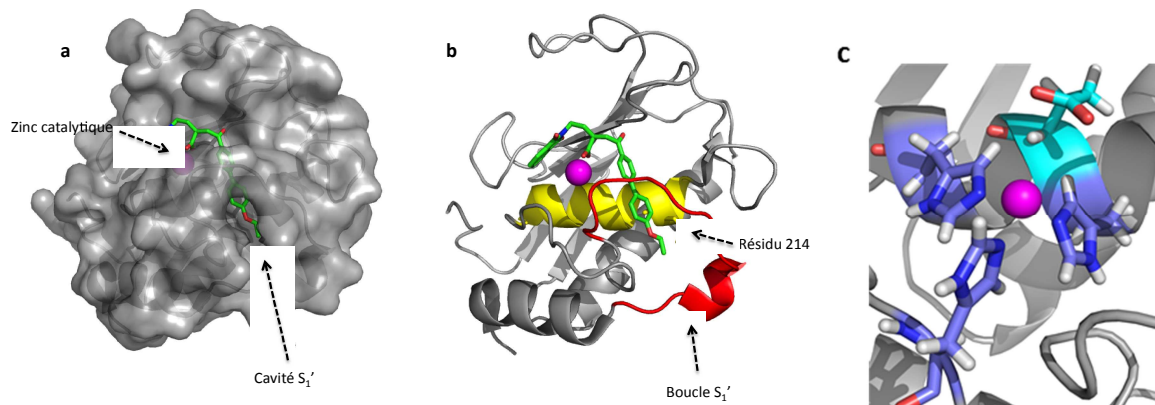


Figure 12 : représentation de gauche à droite du domaine catalytique de la MMP-12 a) traité en mode surface montrant la cavité S₁' b) éléments de structure secondaire avec notamment la boucle S₁' c) détail de la chélation de l'ion zinc par trois histidines et le résidu catalytique Glu pointant au-dessus du zinc

Si on compare la structure des domaines catalytiques des différentes MMP accessibles dans la PDB, la superposition de ces domaines indique une très grande conservation de la topologie du site actif, à l'exception de la boucle S₁'.

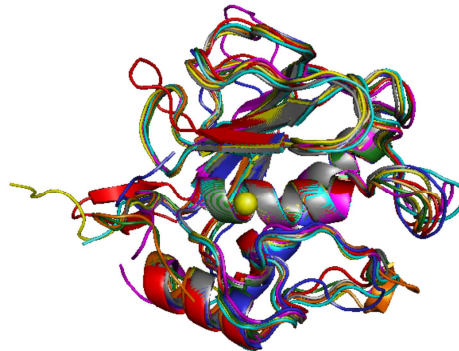


Figure 13 : représentation montrant la conservation des structures secondaires dans la structure tridimensionnelle de différents domaines catalytiques des MMP

En effet, la composition en acides aminés (nombre et nature des résidus) de cette boucle S₁' varie d'une MMP à l'autre. Selon les MMP, ceci se traduit par des différences de flexibilité de la boucle S₁' en solution et donc des volumes de cavité S₁' variables entre les MMP. Le volume de la cavité S₁' est également influencé par la nature du résidu en position 214 (en référence à la MMP-1), résidu porté par l'hélice α définissant la paroi arrière de la cavité S₁' (en jaune sur la Figure 12). Lorsque ce résidu est une leucine, ce qui est le cas chez la plupart des MMP (à l'exception des MMP-1, MMP-7, MMP-11, MMP-17 et MMP19), la cavité S₁' est relativement large et profonde. Dans le cas de la MMP-1 et de la MMP-7, la présence dans cette position d'un résidu arginine (MMP-1) ou d'un résidu tyrosine (MMP-7) pointant vers l'intérieur de la cavité S₁' réduit de façon significative le volume de cette dernière.

Par ailleurs, il est important de signaler que le site actif des MMP partage de fortes similitudes topologiques avec celui d'autres metzincines, telles que les ADAM (A Disintegrin

And Metalloproteases, près de vingt membres chez l'homme) et les ADAM-TS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs, également près d'une vingtaine de membres chez l'homme)^{75,76} comme l'illustre la Figure 14.

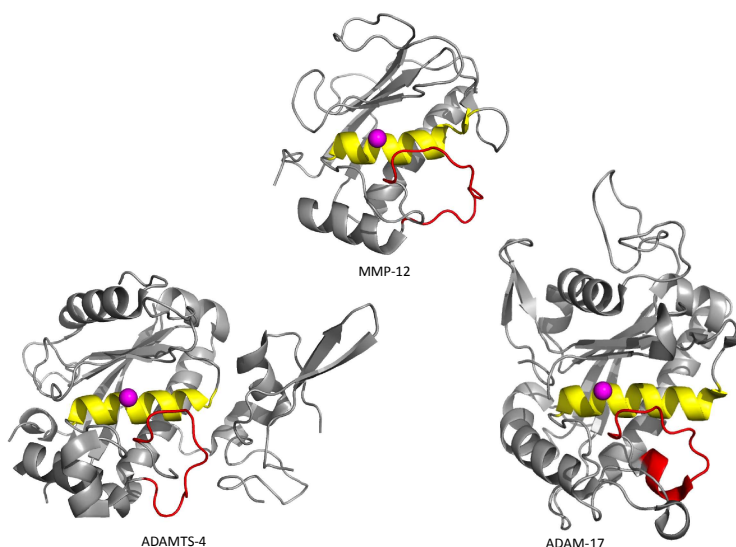


Figure 14 : structure des domaines catalytiques de membres de la famille des MMP, ADAM et ADAMTS dans laquelle on observe la présence d'une hélice- α portant l'atome de zinc et la présence d'une boucle S_1' (en rouge)

Cette similitude explique *a posteriori* pourquoi de nombreux inhibiteurs de MMP se sont révélés être aussi des inhibiteurs puissants vis-à-vis de membres des familles ADAM et ADAM-TS.

IV. Inhibiteurs synthétiques de MMP

La plupart des inhibiteurs de MMP décrits dans la littérature exploitent les particularités structurales décrites ci-dessus et incorporent dans leur structure un groupement capable d'interagir avec l'atome zinc catalytique ainsi qu'une chaîne hydrophobe (position P_1'), susceptible de s'insérer dans la cavité S_1' . En principe et sur la base des considérations structurales évoquées plus haut, l'introduction d'une grande diversité moléculaire au niveau de cette position P_1' (chaînes latérales de longueur et de flexibilité variables) devrait permettre d'identifier des composés capables d'interagir spécifiquement avec une MMP donnée, excluant ainsi les autres membres de la famille. Dans ce sens, plusieurs composés possédant de longues chaînes hydrophobes et rigides en P_1' ont montré de très faibles affinités vis-à-vis des MMP-1 et MMP-7, deux MMP dont la cavité S_1' est peu profonde. Cependant, dans certains cas, de tels inhibiteurs se sont montrés très affins pour ces deux MMP. Lors de la liaison de ces ligands à leur cible, une réorientation des résidus arginine ou tyrosine obstruant respectivement les cavités S_1' de la MMP-1 et de

la MMP-7 a été observée.⁷⁷ Ces résultats soulignent la grande plasticité du sous site S_1' en solution et donc son adaptabilité lors de la liaison de l'inhibiteur à sa cible, une propriété expliquant la difficulté à mettre au point des inhibiteurs sélectifs.⁷⁸

De façon assez décevante et malgré plus de trente années de recherche dans le domaine des inhibiteurs de MMP, peu de composés réellement sélectifs pour une MMP donnée ont été décrits dans la littérature.^{79,80} Du point de vue de la cible, et au-delà des analogies structurales déjà évoquées, c'est bien la dynamique en solution de la boucle S_1' modulant la forme de la cavité hydrophobe et la plasticité du sous site S_1' qui restent difficile à appréhender tant de façon expérimentale qu'avec des approches théoriques de modélisation.^{78,81,82} Du point de vue des inhibiteurs, il est évidemment critique de pouvoir accéder à des données expérimentales de type relation structure-activité, recueillies à partir de composés ayant une grande diversité moléculaire en position P_1' , permettant d'exploiter au mieux les différences topologiques et dynamiques entre les différentes cavités S_1' des MMP et de constater comment ces différences modulent l'activité des inhibiteurs. De plus, le motif interagissant avec l'atome de zinc catalytique doit être considéré avec attention, du fait de son impact sur les profils d'affinité et de sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis des MMP.

Les premières générations d'inhibiteurs de MMP apparues dans la littérature incorporent dans leur structure une séquence peptidique reconnue par les MMP à laquelle était associé un groupement interagissant spécifiquement avec l'ion zinc catalytique.⁷¹ Dans cette série, la majorité des molécules ainsi développées possédaient un groupement chélatant de type acide hydroxamique. L'exploitation de ce motif chélatant a donné lieu à l'identification d'inhibiteurs très puissants vis-à-vis des MMP, tels que la galardine, mais non capables de discriminer entre les MMP et bloquant par ailleurs des membres de la famille ADAM et ADAM-TS. Par ailleurs, *in vivo*, beaucoup de ces inhibiteurs ont affiché un certain nombre de limites avec notamment une forte sensibilité à l'hydrolyse de la fonction hydroxamate et une toxicité musculo-squelettique. Malgré une grande diversité moléculaire introduite notamment au niveau de la position P_1' , la plupart des inhibiteurs développés en série hydroxamate se sont avérés être là encore des inhibiteurs puissants, mais peu sélectifs vis-à-vis des MMP. En revanche, lorsque une fonction carboxylate ou phosphinate est introduite en tant que motif chélatant dans la structure des inhibiteurs, des composés beaucoup plus sélectifs des MMP ont été obtenus.

Pour développer des sondes dirigées contre les MMP, nous nous sommes donc inspirés d'inhibiteurs phosphiniques synthétisés au laboratoire.⁸⁰

I. Systèmes de détection utilisant l'activité catalytique des MMP

La dérégulation du contrôle de l'activité protéolytique des MMP dans de nombreuses pathologies justifie de s'intéresser à la détection des formes actives des MMP.^{83,84} Différentes stratégies utilisant l'activité catalytique des MMP ont été développées et sont décrites ci-dessous.

I. 1. Zymographies

L'une des premières techniques développées pour la détection des formes actives des MMP est la zymographie, qui permet l'identification des MMP par la dégradation d'un substrat et par leurs poids moléculaires. La zymographie est une méthode d'électrophorèse utilisant un gel SDS-PAGE dans lequel un substrat protéique est copolymérisé. Historiquement, la zymographie la plus étudiée est celle utilisant la gélatine. Les autres zymographies développées diffèrent par le substrat protéique utilisé (caséine, collagène, élastine, transferrine).

Cette technique sépare la proforme inactive et de la forme active selon leurs poids moléculaires. Cependant, un des défauts majeurs de cette méthode repose sur son incapacité à distinguer les formes actives de MMP et celles en complexe avec des inhibiteurs naturels. En effet, lors de la préparation des échantillons avant la migration sur gel d'électrophorèse, le complexe enzyme-inhibiteur est dissocié par la présence de SDS. L'activité observée dans le gel est donc à la fois due à la protéine libre et à la protéine libérée de son interaction avec les inhibiteurs.

Lors de la zymographie, les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE dans des conditions non-réductrices. Après élimination du SDS du gel par plusieurs bains de Triton X-100, la protéine est renaturée dans le gel et dégrade son substrat protéique préalablement copolymérisé dans le gel d'électrophorèse. Pendant la renaturation, les proformes des MMP sont activées, suite à la perte de l'interaction entre la cystéine du prodomaine et l'ion zinc catalytique. Les proformes sont donc capables de dégrader le substrat protéique, mais observées à leur poids moléculaire initial, qui est supérieur à celui des protéines actives. Le gel est ensuite coloré au Bleu de Coomassie, puis décoloré à l'aide d'un tampon contenant de l'acide acétique et du méthanol. Les zones de lyses apparaissent comme des bandes blanches sur le gel d'électrophorèse, aux poids moléculaires où les protéases ont dégradé le substrat protéique copolymérisé dans le gel ; le reste du gel est coloré en bleu (Figure 15).⁸⁵

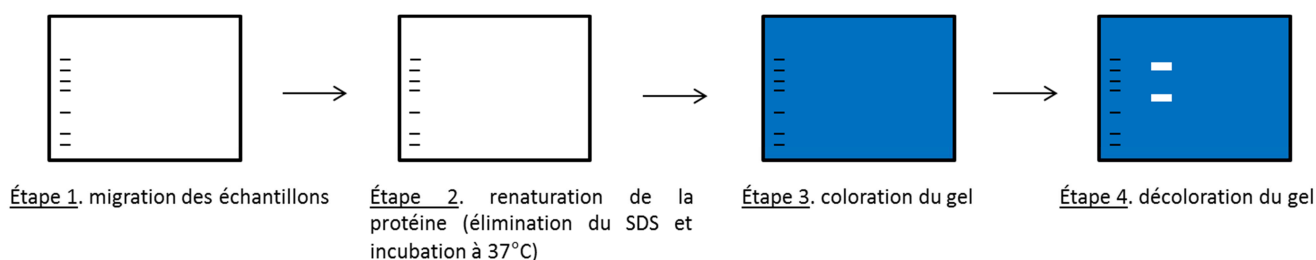


Figure 15 : principales étapes de la zymographie

I. 1. a) Zymographie de gélatine

La zymographie de gélatine a été développée pour la détection des gélatinases : les MMP-2 et MMP-9. Kleiner *et al.* reportent une sensibilité de détection de 10 pg (140 attomoles) de proMMP-2, ce qui en fait une technique extrêmement sensible.⁸⁶ Woessner *et al.*⁸⁷ ont obtenu une sensibilité de détection de 25 pg (270 attomoles) pour la pro-MMP-9 (Figure 16).

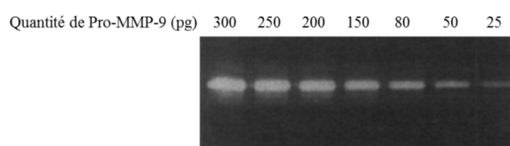


Figure 16 : zymogramme de la détection de la pro-MMP-9⁸⁷

Cette technique a été largement utilisée pour l'étude des activités protéolytiques présentes dans les échantillons biologiques complexes. Par exemple, Barbarosa *et al.* ont mis en évidence la corrélation entre les activités protéolytiques plasmatiques et du sang total issus de personnes exposées au plomb en étudiant les zymographies de gélatine à partir d'échantillons de 40 personnes.⁸⁸ Des activités gélatinases ont été détectées chez les lavages bronchoalvéolaires de patients souffrant de bronchiectasie et le niveau de sévérité de la maladie semble être corrélé avec l'activité protéolytique mesurée par zymographie.⁸⁹

Malgré son utilisation très courante, l'utilisation de la zymographie est limitée par son incapacité à distinguer les formes préalablement complexées avec des inhibiteurs naturels des formes réellement libres. Très souvent, l'activité observée en zymographie est donc surestimée par rapport à l'activité protéolytique réellement présente dans la solution d'échantillon étudiée. Par ailleurs, l'activation des MMP peut prendre place durant la phase de dénaturation des protéines, si des précautions ne sont pas prises. Enfin, le taux de repliement correct effectif des MMP dans le gel a été estimé à seulement 35 % dans le cas des gélatinases, ce qui conduit à une incertitude quant à l'activité totale en MMP d'un échantillon donné.⁸⁷

I. 1. b) Zymographie de caséine

La zymographie de caséine est utilisée pour la détection des stromélysines (MMP-3, MMP-10), la MMP-7 et la MMP-12. Pour la détection des stromélysines, la zymographie de caséine est 50 fois moins sensible (500 pg détectables pour la MMP-1 et MMP-3) que la zymographie de gélatine ne l'est pour la détection des gélatinases (Figure 17).⁹⁰ Pour la MMP-7, la limite de détection est de 1 ng.⁹¹

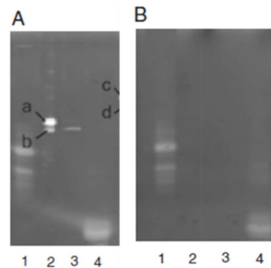


Figure 17 : comparaison de la sensibilité de détection en zymographie de gélatine (A) et de caséine (B). piste 1 : 500 ng de MMP-1 (43 kDa), piste 2 : 100 pg d'un mélange de pro-MMP-2 (a, 72 kDa) et de forme active MMP-2 (b, 68 kDa), piste 3 : 10 pg de forme active de MMP-2, piste 4 : 250 ng de MMP-3 (18,5 kDa)⁹⁰

Les difficultés pour la visualisation de petites protéines sont liées à la migration de la caséine dans le gel. Une première pré-migration du gel pour supprimer l'excès de caséine, puis un dépôt des échantillons et une seconde migration du gel, améliorent nettement ce problème.⁹¹ La zymographie de caséine a été utilisée pour identifier une surexpression de MMP-7 dans des métastases de foies issus de patients ayant un cancer du côlon par rapport à des foies issus de patients sains.⁹²

La zymographie caséine est certainement moins sensible et spécifique que la zymographie gélatine, car de nombreuses protéases peuvent aussi dégrader efficacement la caséine.⁹³

I. 1. c) Zymographie de collagène

La zymographie de collagène est principalement étudiée pour la détection des MMP-1 et MMP-13. Gogly *et al.* rapportent l'utilisation du collagène natif de type I en zymographie, conduisant à une limite de détection pour la MMP-1 de 0,1 pg sous forme active et de 10 pg pour la proforme.⁹⁴

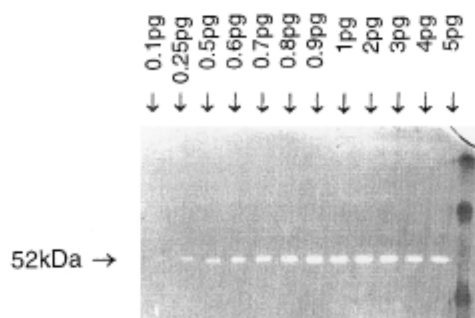


Figure 18 : sensibilité de détection de la forme active de MMP-1 (52 kDa)⁹⁴

I. 1. d) Zymographie d'élastine

La zymographie d'élastine est principalement utilisée pour la détection de l'activité de la MMP-12, mais les MMP-2 et MMP-9 sont aussi capables de dégrader ce substrat.¹⁰⁸ Hautamaki *et al.*⁹⁵ ont démontré l'implication de la MMP-12 dans l'emphysème provoqué par une exposition à la fumée de cigarette. L'activité de dégradation de l'élastine, présente uniquement dans les extraits des poumons des souris exposées aux fumées de cigarette, fait apparaître deux bandes à des poids moléculaires de 45 kDa et de 22 kDa, correspondant aux poids moléculaires attendus pour la MMP-12.

I. 1. e) Zymographie de transferrine carboxyméthylée

Pour la détection de la MMP-7 et des collagénases (MMP-1, MMP-13), des essais avec de la transferrine carboxyméthylée (substrat naturel de la MMP-7) ont été réalisés.⁹⁶ Cette technique était cependant assez peu sensible. Une nette amélioration de la sensibilité a été développée par Yu *et al.*⁹⁷ pour la détection des MMP-1, MMP-7 et MMP-13. Le prétraitement de l'échantillon avec de l'héparine conduit à la limite de détection de 30 pg de pro-MMP-7 de rat (recombinante) en zymographie de transferrine, alors qu'en absence d'héparine, la sensibilité est de 750 pg. Pour la proMMP-1 et la MMP-1 et pour la proMMP-13 et la MMP-13, la sensibilité de détection est améliorée jusqu'à 0,2 ng. L'héparine migre sous forme d'une bande entre 15 et 30 kDa. L'amélioration observée en présence d'héparine intervient dans cette zone de poids moléculaire, en présence de 2 µg à 4 µg par piste de gel de zymographie. Dans le cas de la MMP-7, les différents poids moléculaires des formes inactives (31 kDa), intermédiaires (22 kDa et 26 kDa) et actives (17 kDa et 18 kDa) sont compris dans la bande d'héparine (Figure 19).



Figure 19 : proMMP-7 de rat (entre 1,5 ng et 15 pg) analysée par zymographie de transferrine carboxyméthylée en présence (droite) ou en absence (gauche) de 3 mg/mL d'héparine par piste⁹⁷

Dans le cas des protéines de poids moléculaires plus élevés comme la MMP-1, il est possible d'ajouter l'héparine en cours de migration, ce qui améliore la sensibilité de détection dans la région où l'héparine a migré.

Cette amélioration est aussi observée en zymographie de gélatine. Plusieurs explications sont avancées pour comprendre l'effet de l'héparine sur la sensibilité de détection :

- soit elle induit des changements de conformation qui améliorent l'activité de l'enzyme,
- soit elle aide à la renaturation de la protéine dans le gel,
- soit elle réduit l'autolyse de la protéine,
- soit elle aide à maintenir l'enzyme encrée au gel pendant l'incubation de la zymographie.

I. 1. f) Zymographie *in situ*

Le principe de la zymographie *in situ* reste le même que celui de la zymographie classique (dégradation d'un substrat protéique par les MMP de l'échantillon) adapté pour des coupes de tissus congelés. En plus de fournir des informations sur la présence de formes actives (libres ou en complexe avec les inhibiteurs naturels), l'information de la localisation sur le tissu de ces formes est obtenue. Deux approches sont utilisées : soit une émulsion photographique contenant le substrat protéique, soit un substrat protéique fluorescent l'un ou l'autre étant placé en contact avec la coupe d'organe. Dans le cas de l'émulsion photographique, les MMP présentes sont détectées suite à l'exposition à la lumière et à un développement photographique : elles apparaissent sous forme de taches blanches sur un fond noir. Dans le cas de la dégradation de substrat fluorescent, l'observation en microscopie de fluorescence permet d'obtenir des ronds noirs sur un fond fluorescent lorsque le substrat protéique est dégradé par l'enzyme (Figure 20).⁹⁸

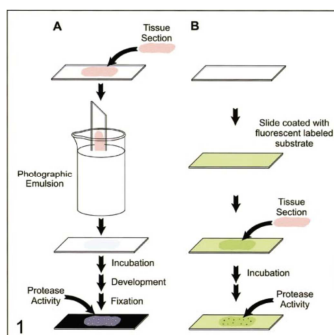


Figure 20 : schéma de principe de la zymographie *in situ* ⁹⁸

La localisation des activités protéolytiques au sein de la coupe de tissu peut être observée. De façon usuelle, la zymographie *in situ* est utilisée pour la dégradation de la gélatine et de la caséine.⁹⁹ Par exemple, Galis *et al.*⁵⁴ ont identifié des activités caséinolytiques et gélatinolytiques dans des coupes congelées d'artères de patients souffrant d'athérosclérose, alors que ces activités sont plus faibles dans les zones ne présentant pas de plaques d'athérosclérose. De plus, ces activités sont partiellement inhibées par de l'EDTA, de la 1,10-phénanthroline et le TIMP-1 (Figure 21). La question de la spécificité de l'inhibiteur employé est un problème majeur pour la caractérisation de l'activité protéolytique observée.

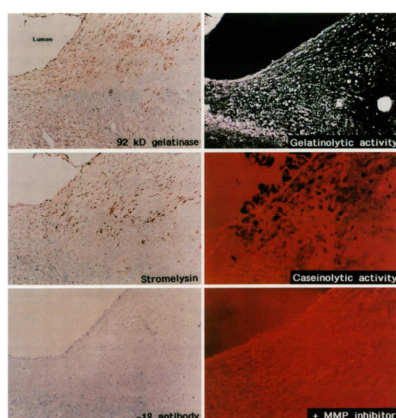


Figure 21 : Détection de MMP en immunocytochimie (à gauche) et en zymographie *in situ* (à droite) dans des coupes congelées de plaques humaines athérosclérotiques. Les zones d'activité gélatinase sont repérées en blanc sur fond noir (détection en photographie, en haut à droite). Les zones d'activité caséinolytique sont repérées en noir sur fond rouge fluorescent (au milieu à droite). En présence de 1,10-phénanthroline (inhibiteur), l'activité caséinolytique (en bas à droite) est fortement diminuée. Immunocytochimie avec l'anticorps anti-gélatinase (en haut à gauche), l'anticorps anti-stromélysine (au milieu à gauche) et sans anticorps primaire incubé ⁵⁴

Nemori *et al.* ont développé une méthode de zymographie *in situ* spécifique pour la détection de la MMP-7, ne réagissant pas avec les MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, et MMP-16 avec la transferrine carboxyméthylée comme substrat protéique.¹⁰⁰

Une autre méthode plus sensible consiste à utiliser un substrat fluorescent FRET.¹⁰¹ La gélatine marquée avec de la fluorescéine isothiocyanate est le plus souvent utilisée,¹⁰² mais des exemples d'utilisation du collagène de type I, du collagène de type IV ou de la caséine, marqués avec des fluorophores quenchés, sont aussi disponibles dans la littérature.

La zymographie *in situ* ne permet cependant pas d'établir quelle protéase est responsable de la dégradation du substrat protéique, et doit donc être complétée avec des expériences d'inhibition réalisées avec des inhibiteurs spécifiques des MMP pour confirmer l'identité de celles-ci ou bien par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, si les quantités de MMP le permettent. Elle apparaît majoritairement comme une technique qui complète d'autres analyses, tout en apportant l'information du lieu de dégradation du substrat au sein d'une coupe de tissu. La zymographie utilisant la méthode photographique entraîne des difficultés d'expérimentation et de normalisation, notamment lors du trempage des coupes de tissus dans l'émulsion photographique. A l'inverse, l'utilisation de la méthode des substrats fluorescents est moins sensible, mais la variante avec des substrats quenchés permet d'améliorer ce point.

I. 1. g) Zymographie en temps réel (real time zymography)

La notion de zymographie en temps réel a été introduite par Hattori *et al.*¹⁰³ Cette variante de la zymographie utilise la gélatine marquée avec de la fluorescéine isothiocyanate. A l'aide d'un transilluminateur, les auteurs ont montré qu'ils pouvaient suivre en temps réel la réaction enzymatique, sans avoir à la stopper pour la visualiser (Figure 22). Cette méthode présente plusieurs avantages par rapport à la zymographie classique : elle permet d'optimiser rapidement les durées d'incubation du gel de zymographie, d'avoir une sensibilité plus importante et elle peut conduire à des analyses semi-quantitatives de l'activité enzymatique observée.

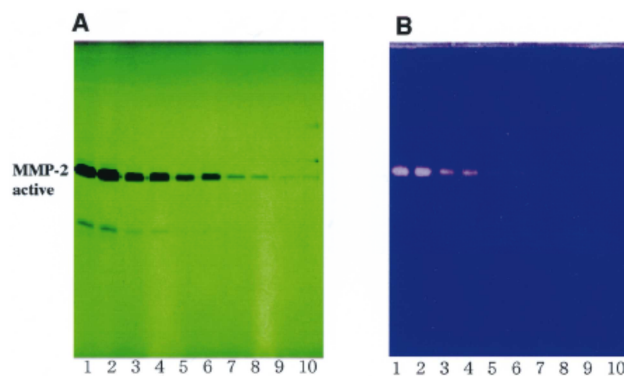


Figure 22 : comparaison de la zymographie conventionnelle et de la zymographie en temps réel. La MMP-2 (forme active, 62 kDa) a été analysée avec un gel de 12% d'acrylamide contenant 0,05% collagène-FITC. A. zymographie en temps réel (bande à 50 kDa est un contaminant de la MMP-3). B. zymographie conventionnelle contenant 0,1% de collagène après 20 h d'incubation à 37°C. pistes 1 et 2: 40 ng MMP-2; pistes 3 et 4 : 8 ng; Pistes 5 et 6 : 1,6 ng ; pistes 7 et 8 : 320 pg ; pistes 9 et 10 : 64 pg¹⁰³

Une amélioration de cette technique permet d'analyser sur un même gel de zymographie la dégradation de deux substrats : la gélatine marquée à la fluorescéine isothiocyanate et la caséine marquée au rouge Texas. Les longueurs d'onde des deux fluorophores étant distinctes, la détection des activités enzymatiques issues d'un mélange de MMP-2, MMP-9 et de MMP-3 a été réalisée sur un même échantillon, avec une sensibilité de 16 pg pour la MMP-2, 3 pg pour la MMP-9 via la gélatine et 0,8 μ U pour la MMP-3 via la caséine (une unité U dégrade 1 μ g de collagène dénaturé par minute à 37 °C, Figure 23).¹⁰⁴

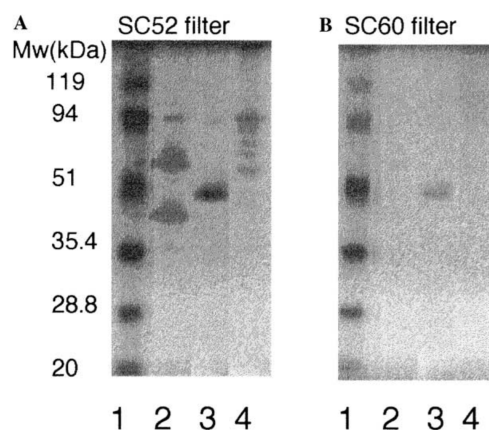


Figure 23 : analyse zymographique en temps réel avec deux filtres sur un transilluminateur : filtre SC52 (A) ou filtre SC60 (B). piste 1 : poids moléculaires ; piste 2 : MMP-2 (10 ng); piste 3 : MMP-3 (6.7 mU) ; piste 4 : MMP-9 (0.5 ng)¹⁰⁴

Pour conclure, les zymographies développées dans la littérature sont des outils permettant la distinction entre les formes actives des MMP et les proformes, à la fois sur des extraits protéiques analysés sur gel d'électrophorèse ou sur une coupe d'organe. Cependant, cette méthode ne permet toujours pas la distinction entre les formes actives libres et les formes actives complexées par les inhibiteurs naturels ; l'activité protéolytique observée n'est donc pas représentative de l'activité réellement présente dans l'échantillon.

I. 2. Substrats naturels protéiques

Afin de détecter l'activité des MMP sur leurs substrats naturels, plusieurs approches ont été développées : des méthodes analytiques pour mesurer la quantité de substrat dégradé, des substrats naturels marqués avec des éléments radioactifs ou des groupements fluorescents, ou encore d'étiquettes (tags) telle la biotine ou des modifications chimiques permettant la détection à certaines longueurs d'onde des produits de dégradation du substrat naturel.

I. 2. a) Substrats protéiques radioactifs

Les substrats naturels marqués en radioactivité (³H, ¹⁴C, ¹²⁵I) ont été initialement utilisés pour la détection d'une activité de dégradation de la gélatine,¹⁰⁵ du collagène natif

ou dénaturé,¹⁰⁶ de la caséine¹⁰⁷ ou de l'élastine.¹⁰⁸ Généralement, les substrats protéiques sont marqués avec de l'anhydride acétique tritié. Après incubation en présence des MMP, les fragments de dégradation radioactifs sont séparés du substrat intact, par centrifugation. Le surnageant contient les fragments de dégradation, qui sont quantifiés avec un compteur de radioactivité. La séparation des fragments et du substrat non dégradé peut aussi se faire par précipitation au dioxane.¹⁰⁹ Koshy *et al.*¹¹⁰ ont adapté deux méthodes au format de plaques 96 puits : en utilisant la centrifugation pour séparer les fragments dégradés, ou en utilisant la filtration sur membrane PVDF sur laquelle le collagène non digéré est retenu.

Cependant, cette méthode ne permet pas d'identifier quelle MMP est responsable de la dégradation du substrat protéique. De plus, elle nécessite de manipuler des éléments radioactifs et génère des déchets radioactifs qu'il faut éliminer via des filières spécifiques.

I. 2. b) Gélatine biotinylée

Paemen *et al.*¹¹¹ ont développé un test pour la détection de la dégradation de la gélatine (collagène de type I dénaturé) biotinylée par la gélatinase B. Pour cela, tout d'abord de l'avidine est adsorbée à la surface de plaques 96 puits (Figure 24A), puis de la gélatine marquée plusieurs fois avec de la biotine sur ses lysines est fixée sur l'avidine (Figure 24B) par une de ces biotines. Après incubation en présence de MMP, la gélatine biotinylée est partiellement dégradée (Figure 24C) et les fragments de dégradation sont éliminés par lavage. Sur la surface des plaques, il ne reste donc que les complexes avidine-biotine-gélatine, avec de la gélatine partiellement dégradée, mais possédant toujours des biotines non liées à l'avidine. Enfin, de l'avidine-peroxydase, capable de se fixer sur les biotines libres de la gélatine, est ajoutée. L'absorbance est mesurée à 450 nm après ajout de peroxyde d'hydrogène et de tetraméthylbenzidine et reflète la quantité de produit issu de l'activité enzymatique de la peroxydase (Figure 24D). Ainsi, plus une activité gélatinase est importante, moins il y aura de gélatine biotinylée et donc l'absorbance à 450 nm sera faible. Cependant, le nombre de biotine présents sur la gélatine étant faible (ainsi que le nombre de lysines libres sur la gélatine), tous les fragments issus de la dégradation de la gélatine par les MMP ne donnent pas un signal accessible à la détection.

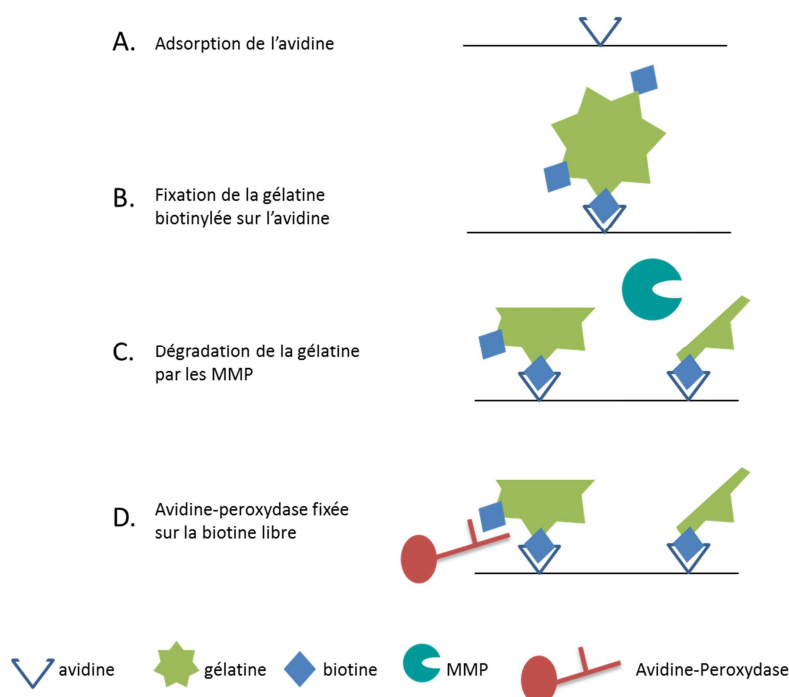


Figure 24 : schéma du principe de détection des activités MMP-2 et MMP-9 avec la gélatine biotinylée¹¹¹

De façon similaire, l'hydrolyse de la gélatine biotinylée par des protéases (thermolysine, trypsine, papaine, pepsine) a été évaluée. A la place du système de détection avec l'avidine-peroxydase, les auteurs utilisent la streptavidine-alkaline phosphatase.¹¹²

Ratnikov *et al.*¹¹³ reportent une variante pour la détection des MMP-2 et MMP-9, capturant spécifiquement les fragments de dégradation de la gélatine biotinylée. De la streptavidine est adsorbée sur des plaques 96 puits. Après préincubation des MMP avec la gélatine biotinylée, les fragments de dégradation de la gélatine sont capturés par la streptavidine présente au fond des puits. Ils sont révélés avec de la streptavidine-peroxydase (streptavidine-HRP) via des substrats colorimétriques mesurant l'activité de la HRP. De plus, cette méthode nécessite que les fragments possèdent deux groupements biotine disponibles à interagir avec la streptavidine adsorbée au fond des puits et avec la streptavidine-peroxydase pour la détection. Plus il y a d'activité enzymatique, plus le signal détecté à 450 nm est important. Cette méthode a une sensibilité de 0,16 ng/mL (100 µL) pour la MMP-2. Utilisant le même type de conditions expérimentales, la MMP-9 peut être détectée avec une sensibilité de 0,15 ng/mL.¹¹⁴

I. 2. c) Substrat protéique succinylé

Cette méthode, développée en plaques 96 puits, repose sur l'utilisation du substrat protéique succinylé et la mesure des amines primaires exposées suite à la dégradation du substrat modifié par les protéases. En effet, le substrat protéique est tout d'abord traité avec de l'anhydride succinique afin de bloquer toutes les amines libres formées présentes

sur celui-ci (Figure 25A). Suite à la dégradation du substrat par les protéases, les amines libres sont détectées par leur réaction avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBSA), conduisant à un composé coloré d'absorbance maximale à 450 nm (Figure 25B).⁸³

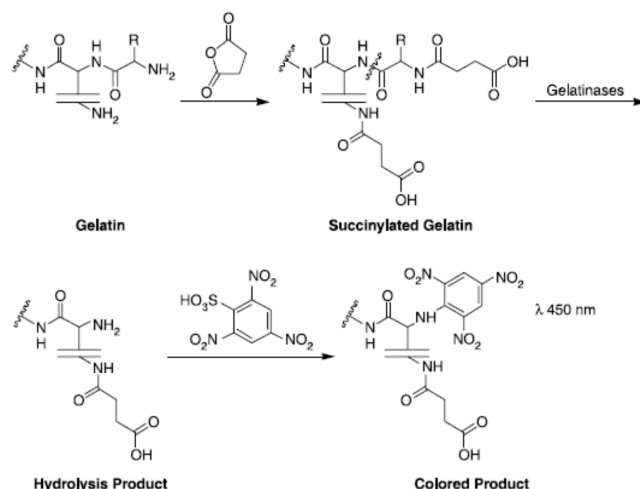


Figure 25 : gélatine succinylée sur ses amines libres et réaction des amines libres avec le TNBSA⁸³

Cette méthode a initialement été appliquée pour la dégradation de l'élastine succinylée par l'élastase pancréatique de porc. La sensibilité reportée est de 1 ng/mL.¹¹⁵

La sensibilité de cette méthode pour la dégradation de la gélatine est de 12,5 ng/mL (1 nM) pour la MMP-9 et 20 ng/mL (2 nM) pour la MMP-2.¹¹⁶ Il est important de noter que le substrat modifié est toujours reconnu par les MMP-2 et MMP-9, et que le signal détecté est proportionnel à la quantité de MMP incubée, dans une gamme de 20 ng à 160 ng pour la MMP-2 et de 12,5 ng à 100 ng pour la MMP-9. La gélatine modifiée est rapidement dégradée par la MMP-2 et la MMP-9, mais elle est aussi dégradée par les MMP-1, MMP-3 et MMP-7. En milieu complexe, cette méthode a été utilisée pour la mesure de l'inhibition des MMP-1, MMP-2 et MMP-9 par des métabolites du pycnogenol (écorce de pin maritime).¹¹⁷ Cependant, même si la MMP-9 est très efficace pour dégrader la gélatine, d'autres protéases sont aptes à dégrader ce substrat. C'est pourquoi en milieu complexe, le ratio de la quantité de MMP-9 par rapport à la quantité des autres protéases présentes dans le milieu est un facteur essentiel. Si le milieu contient trop de protéases dégradant la gélatine, les données seront difficilement interprétables.

I. 2. a) Substrats protéiques fluorescents

Des groupements fluorescents tels que la fluorescéine isothiocyanate (FITC) ou le BODIPY ont été régulièrement employés pour modifier les substrats protéiques. Les substrats marqués avec ces groupements n'émettent pas de fluorescence en raison de la proximité entre les groupements fluorescents. Après dégradation du substrat par les protéases, les peptides marqués sont détectables. L'activité protéolytique est proportionnelle à la fluorescence émise.

Un exemple utilisant la caséine marquée avec du BODIPY dans des plaques microtitres 96 puits a permis la détection d'une activité protéolytique mesurable dans des extraits de plante (*Arabidopsis thaliana*).¹¹⁸

Beaucoup plus récemment, des groupements fluorescents comme la Cyanine 3 sont employés. Leur coefficient d'extinction molaire très élevé permet une nette amélioration de la sensibilité de ces approches. Kong *et al.*¹¹⁹ ont mis au point une méthode où, en présence de MMP-3, la gélatine marquée à la Cyanine 3 au fond des puits de plaques est dégradée. Après lavage, l'analyse de la fluorescence résiduelle est inversement proportionnelle à l'activité de MMP-3 initialement présente (Figure 26). La sensibilité de détection de cette méthode est de 200 ng/ mL.

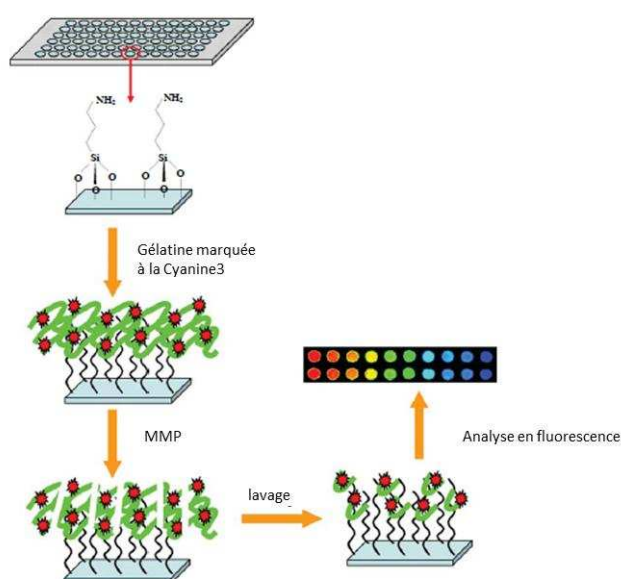


Figure 26 : principe de la méthode de détection de la dégradation de la gélatine marquée à la Cyanine 3¹¹⁹

I. 2. b) Substrats naturels non modifiés

Afin de détecter la dégradation des substrats naturels non modifiés, de nouvelles techniques ont été mises en place, basées sur des biopuces et des méthodes utilisant la SPR (résonance des plasmons de surface).

Gao *et al.*¹²⁰ ont développé une méthode utilisant des films photoniques de silicone nanoporeux pour mesurer la dégradation de la gélatine par la MMP-2. Le support est composé de gélatine (déposée par enduction centrifuge) sur une surface de silicone poreux, qui forme une couche fine, uniforme et lisse sur laquelle les échantillons sont directement déposés. Les produits de la digestion de la gélatine sont capables d'entrer dans les pores et de provoquer des changements de couleurs, visibles à l'œil nu. La limite de détection avec ce type de technique est de 0,1 ng/mL pour la détection de la MMP-2 (Figure 27).

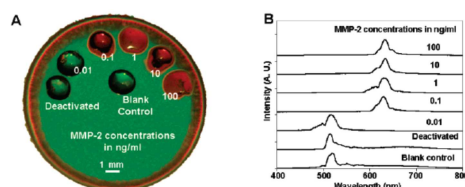


Figure 27 : A. image optique de la dégradation de la gélatine par la MMP-2 B. spectre de la lumière réfléchie de plusieurs concentrations en MMP-2 (1 000 ng/mL MMP-2 désactivée par 10 minutes de chauffage à 100°C, 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 ng/mL de MMP-2)¹²⁰

Une autre approche utilise la SPR¹²¹ pour détecter la dégradation de la gélatine par la MMP-3. La gélatine est immobilisée sur une surface d'or. L'activité protéolytique de la MMP-3 cause une diminution de la longueur d'onde SPR, étudiée par spectroscopie SPR (Figure 28).

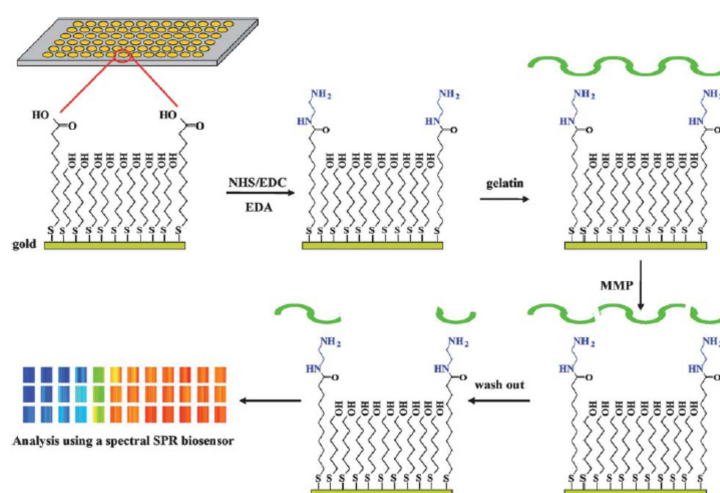


Figure 28 : principe de la méthode de détection utilisant une surface d'or greffée avec de la gélatine et la résonance des plasmons de surface (SPR)¹²¹

La sensibilité de cette méthode SPR pour la détection de la MMP-3 est de 0,5 µg/mL. Il convient cependant de mentionner que ces études ont été réalisées avec des protéines pures.

Ce système a été comparé avec le système par dégradation de gélatine modifiée à la Cyanine 3 (Figure 29).¹²¹ Le système de détection analysé par SPR est plus sensible dans la détection de l'activité de la MMP-3 que le système utilisant la gélatine marquée à la Cyanine 3.

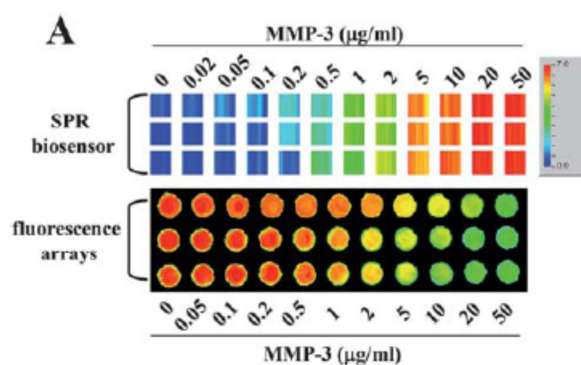


Figure 29 : comparaison de la sensibilité de détection de la dégradation de la gélatine par la MMP-3 par la méthode SPR et par la méthode de détection de la gélatine marquée à la Cyanine 3¹²¹

Une des difficultés de ce type d'approche est l'application en milieu complexe. En effet, les fluides biologiques ou extraits de tissus contiennent beaucoup de protéines, dont certaines sont très abondantes. Les quantités de MMP recherchées sont probablement très inférieures à celles de protéines naturellement abondantes. Ceci peut conduire à un phénomène de « biofouling » (encrassement) sur la puce, où du matériel protéique s'accumule sur la surface de la puce et bloque la détection des MMP. L'utilisation en milieu complexe de cette technique reste donc une étape clef non validée.

I. 3. Substrats synthétiques fluorescents

Afin de mimer les substrats naturels, des substrats synthétiques de petite taille ont été développés.

I. 3. a) Substrats peptidiques commerciaux FRET

Les substrats fluorogéniques utilisés pour la détection de l'activité des MMP font appel au transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). Un groupement émetteur de fluorescence et un groupement quencheur de fluorescence sont ajoutés dans la séquence peptidique substrat des MMP. La proximité du groupement quencheur avec le groupement émetteur de fluorescence empêche ainsi toute détection en fluorescence, à l'état initial. Après coupure du peptide par les MMP, les deux produits formés comportent, pour l'un, le groupement émetteur, et pour l'autre, le groupement quencheur de fluorescence (Figure 30) et se retrouvent éloignés l'un de l'autre. Il est donc possible de mesurer la fluorescence émise en fonction du temps de dégradation du peptide fluorogénique.¹²²

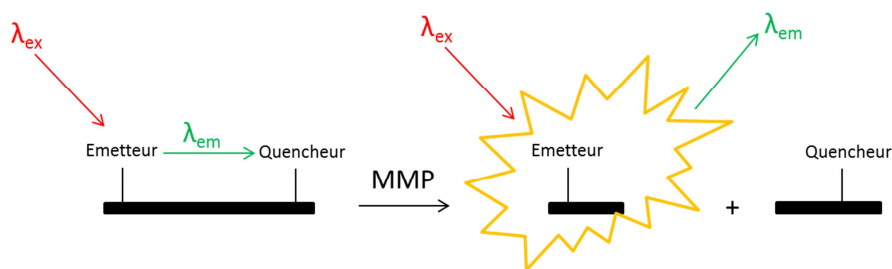


Figure 30 : principe de la coupure des substrats peptidiques FRET par les MMP

Différents substrats commerciaux sont disponibles. Il y a des substrats généraux pour l'activité des MMP, mais aussi certains substrats beaucoup plus spécifiques (MMP-3, MMP-13, MMP-12).

Substrats génériques pour la détection de l'ensemble des activités MMP

Gray *et al.*¹²³ ont développé l'utilisation de la fluorescence du tryptophane, quenchée par le dinitrophényl (Dnp). Le substrat peptidique Dnp-Pro-Leu-Gly+Leu-Trp-Ala-D-Arg-NH₂ est capable d'être dégradé par les collagénases et les gélatinases (« + » représente le site de coupure) et conduit à une augmentation de fluorescence.

Une version avec l'acide 7-méthoxycoumarine-4-acétique (Mca) et le 3-[2,4-dinitrophényl]-L-2,3-diaminopropionyl (Dpa) a permis d'augmenter la sensibilité de détection de 50 à 100, avec le peptide Mca-Pro-Leu-Gly+Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂.¹²⁴ Ce substrat permet une limite de détection de l'ordre de 100 pM pour la MMP-7, 10 nM pour la MMP-1, 3 nM pour la MMP-3, 50 pM pour les gélatinases. Ce substrat commercial est considéré comme un substrat universel pour la détection des activités des MMP (Tableau 1).

Tableau 1 : k_{cat} / K_m pour le substrat Mca-Pro-Leu-Gly+Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ vis-à-vis des MMP

MMP	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9	MMP-10	MMP-12	MMP-13	MMP-14	MMP-17	MMP-19	MMP-20	MMP-25	MMP-26
k_{cat} / K_m (M ⁻¹ .s ⁻¹)	1.10 ⁴	6.10 ⁵	1.10 ⁴	1.10 ⁵	5.10 ⁷	1.10 ⁵	1.10 ⁵	6.10 ⁴	4.10 ⁵	2,4.10 ⁵	2,5.10 ⁴	1,3.10 ³	4,5.10 ⁴	4.10 ⁴	2.10 ³

De plus, l'ajout d'une lysine en position N-terminale (substrat : Mca-Lys-Pro-Leu-Gly+Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂) a permis d'augmenter le k_{cat}/K_m pour les collagénases et la MMP-14, tout en conservant celui des matrilysines et des gélatinases et aussi d'augmenter la solubilité du substrat peptidique (Tableau 2).¹²⁵ Ce substrat permet aussi la détection de l'activité enzymatique de l'ADAM-17 ($k_{cat}/K_m = 7,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). En milieu complexe, avec ce substrat (5 μM) des activités protéolytiques à la surface des cellules T98G ont été mesurées mais cette activité n'est inhibée qu'à 57 % par 10 μM de GM6001 (inhibiteur large spectre

des MMP) et 1 mM AEBSF (inhibiteur de protéases à sérines). Ce substrat manque donc de sélectivité vis-à-vis de la famille des MMP, mais il peut être couplé à des inhibiteurs spécifiques, permettant de déterminer l'activité liée aux MMP.¹²⁵

Tableau 2 : k_{cat} / K_m pour le substrat Mca-Lys-Pro-Leu-Gly+Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ vis-à-vis des MMP

MMP	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-8	MMP-9	MMP-12	MMP-13	MMP-14
$k_{cat} / K_m (M^{-1}.s^{-1})$	9.10^4	$6,9.10^5$	2.10^4	$2,9.10^5$	$4,2.10^5$	$6,2.10^5$	$1,3.10^5$	$1,1.10^6$	$1,3.10^6$

Beekmann *et al.*¹²⁶ ont synthétisé le substrat DABCYL-Gaba-Pro-Gln-Gly+Leu-Glu(EDANS)-Ala-Lys-NH₂ pour détecter l'activité des MMP-1 ($k_{cat}/K_m = 2,1.10^4 M^{-1}s^{-1}$), MMP-2 ($k_{cat}/K_m = 6,19.10^5 M^{-1}s^{-1}$), MMP-3 ($k_{cat}/K_m = 4.10^4 M^{-1}s^{-1}$), MMP-9 ($k_{cat}/K_m = 2,09.10^5 M^{-1}s^{-1}$) en milieu tampon. L'activité protéolytique présente dans des fluides synoviaux de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthrite a été mesurée en présence de 5 μ M de ce substrat. Cette activité est inhibable à 94 % par l'EDTA (10 mM) et à 95 % par le Batimastat (10 μ M), alors que l'aprotinine (inhibiteur des protéases à sérines) n'inhibe pas ce signal. En comparaison avec le signal obtenu avec les sujets sains, le signal détecté est significativement plus élevé dans les fluides synoviaux des patients souffrant d'arthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthrite.

Substrat avec une activité mixte sur les MMP-3, MMP-9 et MMP-13

Le substrat DABCYL- γ -Abu-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu+Nva-Trp-Arg-Glu(EDANS)-Ala-Lys-NH₂ a été développé par Beekman *et al.*¹²⁷ pour la détection des MMP-3 ($k_{cat}/K_m = 2,9.10^4 M^{-1}s^{-1}$), MMP-13 ($k_{cat}/K_m = 1,3.10^4 M^{-1}s^{-1}$), MMP-9 ($k_{cat}/K_m = 7,5.10^3 M^{-1}s^{-1}$). Aucune activité n'est mesurée en présence de MMP-1, MMP-7 et MMP-8. ($k_{cat}/K_m < 1000 M^{-1}s^{-1}$). L'activité enzymatique de la MMP-3 est mesurable dans des fluides synoviaux de sujets sains. De plus, cette activité protéolytique, présente dans les fluides synoviaux de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, est approximativement 100 fois plus élevée que dans les fluides synoviaux des sujets sains.

Substrat spécifique MMP-3

Le substrat Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂ (où Nval = L-norvaline) a été synthétisé par Nagase *et al.*¹²⁸ Il est sélectif de la MMP-3 ($k_{cat}/K_m = 2,18.10^5 M^{-1}s^{-1}$) par rapport à la MMP-9 ($k_{cat}/K_m = 1,0.10^4 M^{-1}s^{-1}$) et n'est pas dégradé par les MMP-1 et MMP-2.

surnageants cellulaires. En comparant l'intensité du signal observé avec le substrat $\alpha 1(V)436-447$ fTHP avec un standard de MMP-2, le signal détecté pourrait correspondre à une activité de 1,02 nM de MMP présente dans les surnageants.

I. 3. c) Substrats peptidiques et détection à l'argent

Une autre approche originale pour la détection des formes actives de MMP-7 utilise des biopuces comprenant un peptide lié à des nanoparticules d'or et une révélation à l'argent.¹³³ Pour cela, une surface solide est modifiée par de l'acide nitrilotriacétique (NTA), puis saturée par des ions Ni^{2+} , chélatés par l'acide. Une sonde composée de nanoparticules d'or greffées avec un peptide contenant une séquence reconnue par la MMP-7 et six Histidine, est incubée sur le support solide (Figure 33). Via les histidines, cette sonde chélate elle aussi les ions Ni^{2+} . Lors de l'ajout de MMP-7, le peptide greffé sur les nanoparticules est dégradé. Puis, après lavage et élimination des fragments dégradés, seules les nanoparticules possédant un peptide intact sont encore présentes à la surface de la puce. La révélation se fait avec un kit "Silver Enhancer" (Sigma-Aldrich), qui permet d'avoir un signal visible de la précipitation de l'argent métallique au niveau des nanoparticules d'or portant le peptide. Ainsi, dans ce système, seuls les peptides intacts sont révélés : la coloration du signal est donc inversement proportionnelle à la quantité de protéase présente.

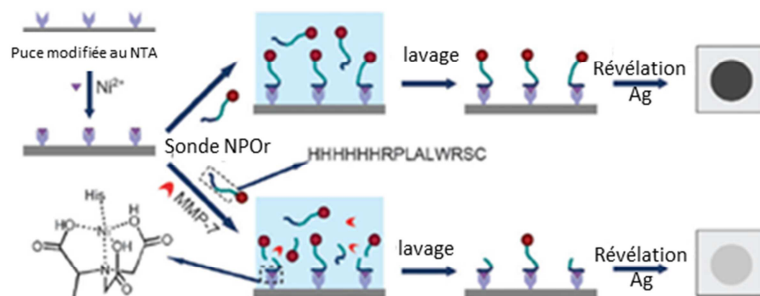


Figure 33 : principe de la détection de l'activité de la MMP-7 avec des biopuces comprenant un peptide greffé sur des nanoparticules d'or¹³³

Ce type d'approche a une sensibilité de détection de 0,1 ng/mL (4,8 pM) pour la MMP-7 et le signal observé est linéaire par rapport à la quantité de MMP-7 utilisée dans la gamme 0,1 ng/mL à 100 ng/mL (Figure 34). De plus, le volume analysé est de 2,5 μ L, ce qui correspond donc à une sensibilité de détection de 12 amol de MMP-7.

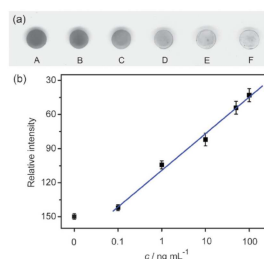


Figure 34 : a. image des spots correspondant à 0, 0.1, 1, 10, 50, and 100 ng/mL de MMP-7 (A-F) b. linéarité du signal en fonction de la quantité de MMP-7 (3 spots différents)

Dans des surnageants de cellules K562, une concentration de 1,38 ng/mL de MMP-7 a été déterminée, en accord avec la concentration de 1,2 ng/mL obtenue par test ELISA. Dans ce même milieu complexe, cette approche a permis la détection d'un ajout d'une quantité connue de MMP-7, allant de 1 à 50 ng/mL. Malgré ces atouts, cette méthode est cependant très dépendante de la spécificité des substrats peptidiques utilisés. Comme précédemment mentionné, le manque de spécificité en milieu complexe peut conduire à une surestimation de la quantité de MMP présente dans les milieux étudiés.

Les substrats synthétiques sont donc des outils permettant la détection des formes actives des MMP. Cependant, en milieu complexe, ces substrats peuvent être dégradés par des protéases de façon non-spécifique. Pour améliorer la spécificité des substrats, des approches utilisant une étape d'immunocapture ont été mises en place.

I. 4. Immunocapture et détection des formes actives de MMP

Afin d'accroître la sélectivité dans la détection des formes actives de MMP, des méthodes utilisant une première étape d'immunocapture par un anticorps sélectif d'une MMP particulière ont été utilisés, avant une deuxième étape de détection.

I. 4. a) Immunocapture et substrats peptidiques

Les premiers essais d'immunocapture pour des MMP ont été proposés par Verheijen *et al.*¹³⁴ Après capture de la MMP par un anticorps spécifique, les formes actives sont capables de dégrader le propeptide d'une pro-urokinase (proUKCOL) ainsi transformée en urokinase active (UKCOL). Cette dernière est capable de dégrader un peptide substrat conduisant à la formation d'un produit coloré, dont l'absorbance maximale est à 405 nm (Figure 35).

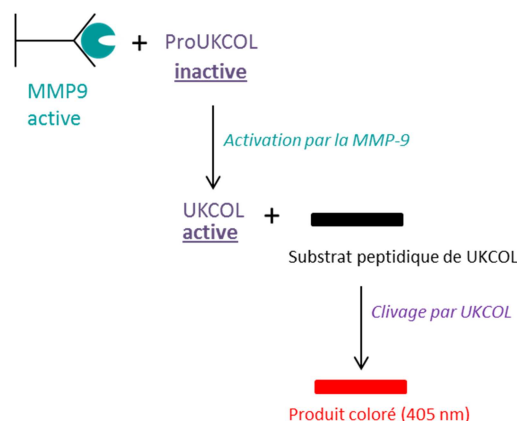


Figure 35 : schéma du principe de l'immunocapture de la MMP-9 par un anticorps¹³⁶

Une autre variante consiste à activer les proenzymes par l'APMA, après leur fixation sur l'anticorps monoclonal, afin de connaître l'activité issue des protéases libres et des proformes présentes dans les échantillons. Ceci permet, par comparaison entre la mesure d'activité avant et après l'activation à l'APMA, de connaître la quantité de proformes initiales dans l'échantillon.

Dans une expérience mettant en jeu de la MMP-9 humaine recombinante active et un anticorps monoclonal anti-MMP-9 humaine, Verheijen *et al.* ont obtenu une réponse linéaire en fonction de la concentration initiale, dans une gamme de 0,06 ng/mL à 32 ng/mL de hMMP-9. La hMMP-2 n'interagissant pas avec l'anticorps dirigé contre la hMMP-9, cette méthode permet donc la distinction entre ces deux gélatinases. Par ailleurs, l'activité mesurée est inhibable par le TIMP-2, montrant que le signal observé est bien spécifique d'une forme active de MMP-9. Cette technique a une sensibilité de 60 pg/mL.¹³⁵

Cette méthode a été validée en milieu complexe pour l'étude de l'activité enzymatique de la MMP-9 dans la salive de patients souffrant du syndrome de Sjögren.¹³⁶ De façon intéressante, l'activité enzymatique et l'activité enzymatique totale (après activation des proformes) mesurées sont plus élevées dans les échantillons des patients souffrant du syndrome de Sjögren que dans les échantillons de personnes saines. Cette technique a été comparée à une approche utilisant la dégradation de la gélatine marquée à l'iode 125 : elle est plus sensible et de plus, donne l'information de la MMP à l'origine de la dégradation du substrat.

Cette méthode a aussi été employée pour la détection de l'activité protéolytique de la MMP-9 sur des échantillons d'urine de patients ayant des carcinomes dans la vessie. Des niveaux élevés de MMP-9 sous formes actives et proformes ont été trouvés chez les patients par rapport aux personnes saines.¹³⁷ Une méthode similaire utilisant un anticorps spécifique pour la détection de la MMP-2 a aussi été développée.¹³⁸

Vernooy *et al.*¹³⁹ ont aussi utilisé cette méthode pour mesurer l'activité enzymatique des MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-13 présentes dans les *sputa* de patients

souffrant de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les limites de détection en tampon sont de 1,4 ng/mL, 1,3 ng/mL, 5,0 ng/mL, 2,7 ng/mL, 8,3 ng/mL pour respectivement les MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 et MMP-13. L'activité des MMP-8 et MMP-9 est significativement plus importante chez les patients souffrant de BPCO par rapport aux sujets sains, tandis que l'activité de la MMP-1 est similaire dans les deux populations. Les activités de la MMP-2 et de la MMP-13 sont restées en dessous des limites de détection.

Une autre variante à ce protocole a été proposée par Lauer-Fields *et al.*¹⁴⁰ : pour cela, suite à la capture des MMP à l'aide d'un anticorps monoclonal, un substrat peptidique fluorogénique de structure en triple-hélice est dégradé par les MMP (Figure 36).

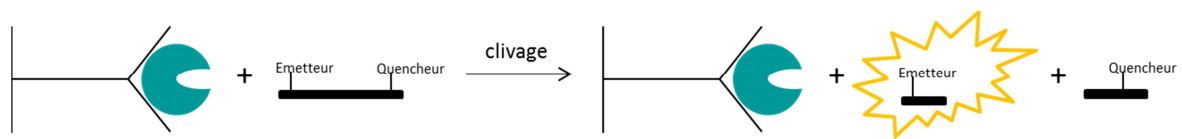


Figure 36 : schéma de principe du test de l'activité enzymatique des MMP, avec l'anticorps monoclonal fixé sur un puits, la MMP spécifiquement reconnue et le substrat fluorescent dégradé par la MMP¹⁴⁰

Dans cette méthode, un anticorps monoclonal dirigé contre une MMP est immobilisé sur le fond d'un puits d'une plaque 96 puits. Puis, la protéase est ajoutée et reconnue spécifiquement par cet anticorps monoclonal. L'interaction a lieu sur une surface éloignée du site actif de l'enzyme, permettant la conservation de son activité protéolytique. La dégradation du substrat fluorogénique fTHP-7 par la protéase conduit à l'émission de fluorescence du substrat FRET (Figure 36).

L'application de cette méthode pour la détection des MMP-1, MMP-3, MMP-13 et MMP-14 a été étudiée : cette méthode permet de détecter 1 fmol de forme active de MMP-1 dans 200 μ L (5 pM). De plus, des essais avec des anticorps non spécifiques (IgG de souris) et en présence de substrat fTHP7 ne montrent pas de signal de fluorescence, indiquant que ce signal est bien spécifique d'une activité MMP-1. Enfin, il a été vérifié que l'anticorps n'interagissait pas avec la hMMP-13.

L'activité enzymatique des formes actives des MMP-1, MMP-3, MMP-13 et MMP-14 (solubles) a été ensuite analysée dans les surnageants de culture cellulaire de mélanome M14. Trois lignées cellulaires, dont les niveaux d'expression de certains récepteurs à la surface sont différents, ont été utilisées : la lignée M14#11 (avec un niveau d'expression de CD44 faible), la lignée M14P (servant de référence) et la lignée M14#5 (dans laquelle le niveau de CD44 est plus important que chez la lignée M14P). L'objectif du travail était de déterminer si les niveaux d'expression de CD44 ont une influence sur les MMP exprimées. Les quantités mesurées de MMP-1 et MMP-3 sont faibles (1,37 ng/mL et 1,47 ng/mL, respectivement) tandis que celles de MMP-13 (27,1 ng/mL) et de MMP-14 (2,19 ng/mL) sont

plus élevés dans les surnageants de culture issus des lignées cellulaires M14#5.¹⁴⁰ Ces résultats sont en accord avec des études montrant que CD44 pourraient s'associer avec la MMP-14 pendant la migration cellulaire tumorale et que la MMP-14 pourrait activer la proMMP-13.

Le même principe d'immunocapture puis d'ajout d'un substrat fluorescent a été employé par LaPan *et al.*¹⁴¹ pour la détection de l'activité de la MMP-12 dans des expectorations de patients souffrant de BPCO. La comparaison de plusieurs anticorps monoclonaux anti-MMP-12 et de plusieurs substrats a conduit à la mise en place d'un nouveau système de détection des formes actives de MMP-12, capable de détecter jusqu'à 1 ng/mL de celles-ci. Cependant, les concentrations détectées de ces formes actives présentes chez les sujets sains et les patients ne sont pas significativement différentes. Cependant, une étude plus récente montre une corrélation entre l'activité MMP-12 mesurée et la sévérité de la pathologie BPCO dans les *sputa* des patients. Les mesures d'activité ont été réalisées avec le même type de méthode (immunocapture et substrats fluorogéniques) sur une cohorte de 208 personnes.

Ces techniques de détection en deux étapes (immunocapture puis ajout d'un substrat fluorescent) permettent d'améliorer la spécificité des signaux observés, notamment en milieu complexe. Néanmoins, elles nécessitent de pouvoir disposer d'anticorps monoclonaux, dont la spécificité de capture ait été démontrée.

I. 4. b) Test « sandwich »

Pieper-Fürst *et al.*¹⁴² ont décrit un test sandwich utilisant la résonance des plasmons de surface (SPR) pour détecter la présence des MMP. Dans cette méthode, d'une part, un anticorps monoclonal dirigé contre la proMMP-2 et la MMP-2 active (d'épitope inconnu) est adsorbé sur des particules d'or. De la BSA est adsorbée sur les surfaces libres des nanoparticules, permettant de limiter des interactions non-spécifiques. D'autre part, des TIMP-2 sont adsorbés sur une surface plane d'or (Figure 37). En présence de MMP-2, un complexe ternaire TIMP-MMP-anticorps est fixé sur la surface d'or. Ce complexe est détecté en flux continu par une méthode de SPR (débit de 2 μ L/min, lecture à 1050 s après injection de la solution). La limite de détection avec cette méthode est de 0,5 pM de hMMP-2 (35 amoles, 2,5 pg, dans 70 μ L).

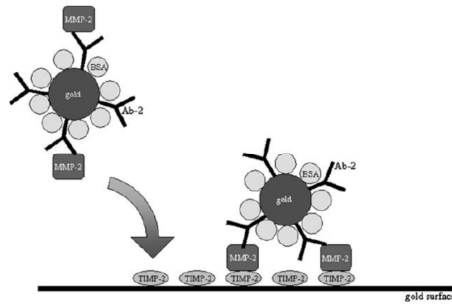


Figure 37 : système de détection sandwich pour la détection de la MMP-2. Le TIMP-2 est immobilisé sur une surface d'or. Un mélange de MMP-2 et anticorps anti-MMP-2 adsorbé sur des nanoparticules d'or est ajouté. Le lien est suivi par SPR

Dans la mesure où le TIMP-2 possède deux sites de liaison pour la MMP-2 (un site dans le domaine C-terminal et un site dans le site catalytique), cette technique permet donc la détection des formes actives des MMP ainsi que des proformes. Les formes préalablement complexées avec les TIMP ne devraient pas être détectables dans ce système.

Cependant, malgré une très grande sensibilité, là encore, dans un milieu complexe, le phénomène de « biofouling » peut perturber la mesure de la présence des MMP. De plus, l'anticorps ici développé n'étant pas spécifique des formes actives de la MMP-2, ce système détecte à la fois des formes actives et des proformes des MMP-2.

Pour résumer, l'ensemble des systèmes de détections présentés précédemment utilise la capacité des MMP à dégrader un substrat, et ne révèle donc que les formes actives des MMP. Une méthode idéale permettrait, à l'aide d'un substrat spécifique d'une MMP, de détecter les formes actives de celle-ci, cependant, dans les différentes méthodes précédemment citées, aucune ne permet de conclure de façon certaine sur la présence de formes actives d'une MMP donnée. En effet, l'utilisation de substrats protéiques naturels, marqués ou non, ne donne pas d'informations complètes sur la nature des MMP mises en jeu lors de la dégradation de ce substrat. Le même problème de sélectivité est aussi soulevé dans l'utilisation de substrats peptidiques, notamment en milieu complexe. Enfin, la zymographie, bien que très sensible, ne permet pas de distinguer les formes actives des formes inactivées, en complexe avec les inhibiteurs naturels. Il semble donc que ces différentes méthodes ne s'appliquent pas à l'ensemble des MMP et ne se prêtent pas pour identifier quelles sont les cibles d'inhibiteurs de MMP *in vivo*. Face aux limites de ces techniques, de nouvelles approches ont été mises en place, utilisant des inhibiteurs de MMP pour la détection des formes actives.

II. Utilisation d'inhibiteurs de MMP pour détecter les formes actives

Afin de détecter les formes actives des MMP, il est possible d'utiliser des inhibiteurs aptes à former des complexes d'affinité ou covalents. Mobashery *et al.* ont essayé de développer des inhibiteurs modifiant de façon covalente les MMP, en exploitant la présence du glutamate dans le site actif. Une autre méthode repose sur l'utilisation d'inhibiteurs greffés sur un support solide permettant l'enrichissement et la sélection des formes actives de MMP. Enfin, l'utilisation des sondes « Activity Based Probe » (ABP) et notamment des sondes « Affinity Activity-Based Probe » (AfBP) est une stratégie qui permet le marquage covalent des formes actives des MMP.

II. 1. Essais avec des inhibiteurs covalents

Mobashery *et al.*¹⁴³ ont développé des inhibiteurs suicides, capable de modifier de façon covalente les MMP. En effet, le groupement thiirane présent sur les inhibiteurs est susceptible d'être attaqué par l'acide carboxylique du glutamate 404 pour former une nouvelle liaison ester (Figure 38).¹⁴⁴

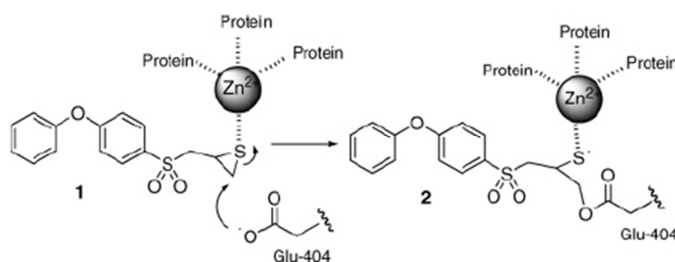


Figure 38 : principe de la modification covalente du glutamate 404 par l'inhibiteur covalent développé par Mobashery *et al.*¹⁴⁴

L'inhibiteur SB-3CT a une affinité de 13 nM pour la MMP-2, 600 nM pour la MMP-9 et supérieure à 10 μ M pour les MMP-3, MMP-1 et MMP-7.¹⁴³ Le SB-3CT est un inhibiteur (50 mg/kg) des métastases du foie et augmente la survie des animaux dans un modèle murin lymphome agressif.¹⁴⁵ Ce composé s'est révélé aussi efficace dans plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* de maladies neurologiques. Cependant, il faut remarquer que la formation du lien covalent entre l'inhibiteur et la protéine n'a jamais pu être démontrée. A ce jour, ces inhibiteurs n'ont pas été exploités pour synthétiser des sondes permettant la détection de formes actives de MMP.

II. 2. Utilisation d'inhibiteurs greffés sur un support solide

Un inhibiteur des MMP est immobilisé sur une résine et capture ainsi, de façon spécifique les MMP présentes dans les milieux étudiés. Cette technique permet d'enrichir

l'échantillon en forme active de MMP, notamment si les volumes à traiter sont très élevés. Les protéines en interaction avec l'inhibiteur greffé sont éluées de la colonne avec du tampon de Laemmli et analysées par gel d'électrophorèse, par zymographie ou par western blot.

L'équipe de Mobashery a développé une résine de Sépharose greffée avec un dérivé du Batimastat (composé 2, Figure 39).¹⁴⁶

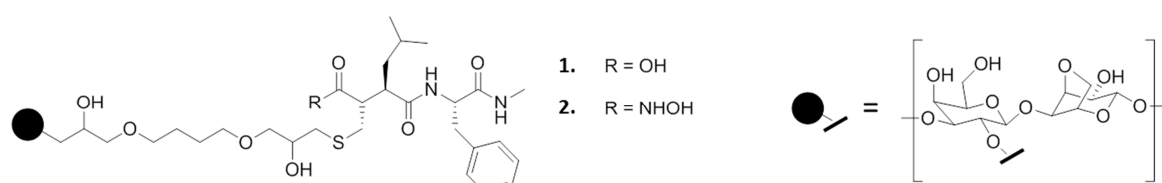


Figure 39 : structure chimique de l'inhibiteur hydroxamate dérivé du Batimastat (composé 2) greffé sur une résine Sépharose¹⁴⁷

Couplée avec de la détection en zymographie de gélatine, cette résine est capable de retenir les formes actives des hMMP-2 et hMMP-9 étudiées, mais n'interagit pas avec les proformes de ces enzymes. De plus, elle ne retient pas la hMMP-2 ou la hMMP-9 en complexe d'affinité avec le TIMP-2, ce qui en fait un outil très intéressant pour la détection des formes libres de MMP actives. La question de la limite de détection avec ce type de résine n'est pas abordée, mais 20 ng de protéines sont détectés.¹⁴⁶

La détection de forme active de la hMMP-2 est réalisée dans des lysats de cellules HT1080 de fibrosarcome connues pour sécréter des progélatinases, des TIMP¹⁴⁸ et de la hMMP-2 sous forme active suite à une stimulation avec de la concanavaleine A. De façon intéressante, de la forme active de la hMMP-2 est retrouvée dans la fraction non-retenue, et les auteurs démontrent que celle-ci n'est pas disponible dans une interaction avec un inhibiteur, car liée à du TIMP-2. Une question non résolue concerne l'accessibilité de l'inhibiteur sur la résine en milieu complexe : la présence de grandes quantités de protéines peut gêner l'interaction entre l'inhibiteur et sa cible. Par ailleurs, la quantité de matériel utilisée est très importante : 15 mL de lysats cellulaires sont élués dans un volume final de 150 μ L (concentration d'un facteur 100 par rapport au volume initial).

Dans des extraits de carcinome du sein et du larynx, cette résine a permis la détection de formes actives de hMMP-2 dans la fraction retenue sur la résine. Une partie de cette hMMP-2 est toujours présente dans la fraction non retenue, ce qui peut s'expliquer par la présence de formes actives bloquées par les TIMP et donc non retenues sur la colonne (Figure 40). De plus, de la hMMP-14 est détectée par western blot dans la fraction retenue sur la résine.

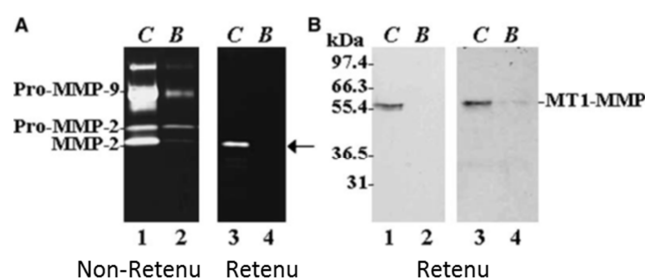


Figure 40 : A. zymographie de gélatine des fractions non-retenues et retenues des extraits de carcinome (piste 1, 3) et bénin (piste 2, 4) B. Western Blot avec un anticorps anti-MMP14 des extraits de larynx (piste 1, 2) et de sein (piste 3, 4) et carcinome (piste 1, 3) et bénin (piste 2, 4) après passage sur l'inhibiteur supporté¹⁴⁷

Cette méthode a donc prouvé son efficacité dans l'étude des gélatinases, via la sensibilité apportée par la zymographie, ainsi que dans la détection de la présence de hMMP-14. Il convient cependant de remarquer que les quantités de matériel biologique utilisées sont très importantes.

De façon similaire, l'équipe de Bischoff a développé une résine Sépharose greffée avec un inhibiteur Pro-Leu-Gly-NHOH où NHOH est la fonction hydroxamate.¹⁴⁹ L'affinité de cet inhibiteur greffé est de l'ordre du micromolaire vis-à-vis des hMMP. Là encore, cette résine ne retient que les formes actives de MMP.

Une application de cette résine en milieu complexe a permis d'identifier la présence de formes actives de hMMP-9 dans des fluides synoviaux issus de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, comme présenté en Figure 41.¹⁵⁰

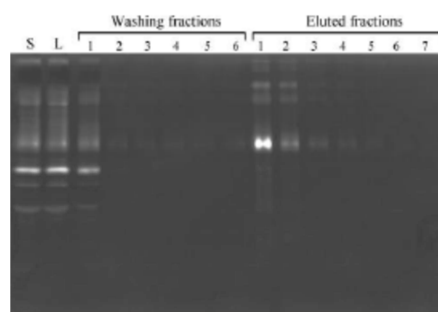


Figure 41 : zymographie de gélatine des fluides synoviaux de patients avant passage sur résine (S), fractions non-retenues (L), fractions de lavages (Washing fractions 1-6) et fractions éluées (Eluted fractions 1-7)¹⁵⁰

Il est intéressant de noter que l'échantillon de départ, avant passage sur la colonne (fraction S) présente un profil en zymographie de gélatine proche de la fraction non-retenue (fraction L), tandis que l'activité de la MMP-9 observée dans les fractions d'élutions (Eluted fractions 1 à 7) est très importante. La présence de MMP-9 active, dans ce milieu, n'est clairement détectable qu'après lavage, lors duquel les protéines abondantes sont éliminées, et l'échantillon concentré. Il se peut que l'échantillon biologique ait évolué pendant la phase de concentration, conduisant à une auto-activation de la protéase pendant cette étape. Ceci

indique bien la difficulté de détection des MMP par des méthodes classiques en milieu complexe, au sein d'un protéome riche en protéines, ainsi que la difficulté du traitement de ces échantillons biologiques contenant des activités protéolytiques. En outre, les proformes et les formes actives complexées avec les inhibiteurs naturels ne devraient pas être détectées dans cette approche. Dans cette technique utilisant un inhibiteur large spectre des MMP, la détection après enrichissement sur colonne est à l'origine de la sélectivité. En effet, dans le cas des gélatinases, la zymographie de gélatine permet une très grande sensibilité de détection de ce système. Cependant, pour mesurer des activités liées à d'autres MMP, il est nécessaire d'avoir recours à d'autres techniques (par exemple l'utilisation d'anticorps en western blot) pour détecter la présence des MMP, ce qui peut poser des problèmes en terme de sensibilité et aussi d'universalité de la méthode (il est nécessaire d'avoir un anticorps par MMP et il doit être spécifique).

Un autre inhibiteur de type hydroxamate (Figure 42) greffé sur une résine Sépharose a été synthétisé et adapté sur un système automatique d'extraction en phase solide pour une utilisation à haut débit par l'équipe de Bischoff.¹⁵⁰ Ce composé greffé a une affinité nanomolaire vis-à-vis des hMMP-1, hMMP-7, hMMP-8, hMMP-12 et hMMP-13 et une affinité de 200 nM pour la hMMP-10. Testé avec 50 ng de hMMP-12 et de hMMP-9, ce système permet de récupérer plus de 95 % de la protéine après lavages et élution avec un tampon de 50 mM Tris, 5 mM d'EDTA, 0,05 % brij-35 à pH 8,5.

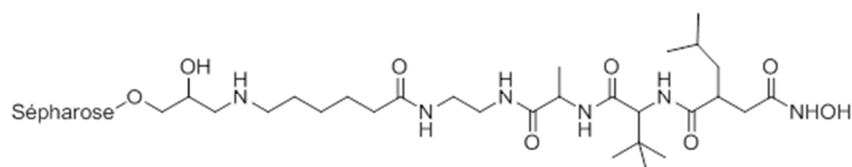


Figure 42 : structure de l'inhibiteur TAPI-2 greffé sur Sépharose, développé par Bischoff *et al.*¹⁵⁰

Testé sur cinq MMP recombinantes (hMMP-1, hMMP-7, hMMP-8, hMMP-10 et hMMP-13), ce système permet de récupérer des protéines pures injectées avec un rendement de plus de 99 %.

L'utilisation de cette deuxième génération d'inhibiteurs supportés n'a cependant pas été testée en milieu complexe. Il est probable qu'un enrichissement en métalloprotéines (non MMP) via la capture par l'inhibiteur supporté en milieu complexe ait lieu.

Une approche complémentaire développée par Bischoff *et al.*¹⁵¹ consiste à utiliser l'inhibiteur supporté couplé à de l'HPLC-MS. La méthode est basée sur l'enrichissement de MMP avec l'inhibiteur TAPI-2 supporté, digestion sur un réacteur contenant de la trypsine immobilisée et capture de peptides sur une colonne en phase inverse, suivi d'une analyse en nanoLC-MS. Ce système a permis l'identification de 4 pmol de hMMP-12 (8 nM dans 500 µL) dans de l'urine, analysée en 75 minutes avec un système automatisé. Cependant, avec des

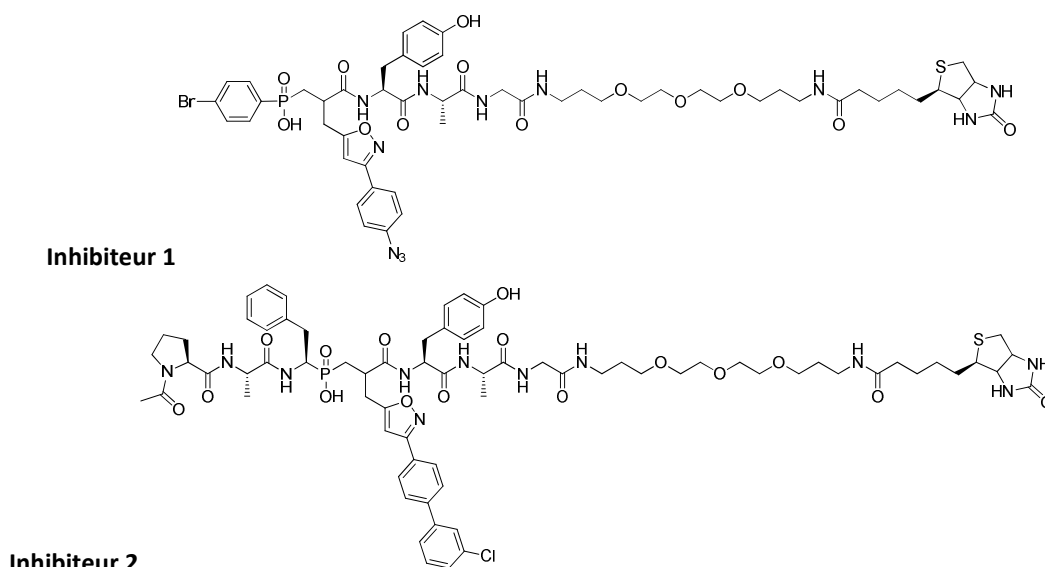


Figure 44 : structure chimique de l'inhibiteur photoactivable 1 et de l'inhibiteur 2

L'inhibiteur biotinylé (inhibiteur 2) a une affinité picomolaire pour les hMMP, tandis que la sonde photoactivable (portant un groupement de type azoture, inhibiteur 1) a une affinité subnanomolaire pour les MMP. Le protocole de capture consiste à incuber les milieux en présence d'inhibiteur pour former un complexe enzyme-inhibiteur, (éventuellement photoirradier le complexe pour former le lien covalent enzyme-inhibiteur, pour la sonde 1), puis à ajouter les billes magnétiques de streptavidine, afin de former un complexe ternaire streptavidine-inhibiteur-enzyme. La stabilité de ce complexe permet d'éliminer les fractions non-retenues sur les billes et de réaliser des lavages afin de limiter au maximum les interactions non-spécifiques. Le complexe enzyme-inhibiteur est élué des billes soit avec du tampon de Laemmli avant analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, soit avec une solution de bicarbonate de sodium 50 mM / acétonitrile (9/1), avant digestion trypsique et analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Utilisant l'approche de capture couplée à l'identification par gel d'électrophorèse ou par spectrométrie de masse, une capture spécifique de 500 femtomoles de hMMP-12 et hMMP-8 en tampon a été réalisée. Au vu des résultats obtenus, il semble que l'inhibiteur 2 conduise à un meilleur rendement de capture des hMMP-8 et hMMP-12 que l'inhibiteur 1. En milieu complexe, l'identification de MMP recombinantes, chacune ajoutées à un extrait tumoral (10 µg de protéines), a aussi été réalisée avec soit 10 ng de hMMP-12, soit 26 ng de hMMP-8, en présence de 30 nM d'inhibiteur 2. Dans le but d'étudier la sensibilité de la méthode, chacun des constituants du mélange de hMMP-2, hMMP-12 et hMMP-8 (500 femtomoles de chacune d'entre elles) additionné aussi à 10 µg d'extrait tumoral en présence de 30 nM de l'inhibiteur 2 a été identifié sans ambiguïté par spectrométrie de masse, en utilisant seulement 1/20^{ème} de ce matériel pour la spectrométrie de masse

(25 femtomoles par peptides). Ainsi l'inhibiteur 2 possède une limite de détection très basse, et sa validation en milieu complexe en fait un outil puissant pour la détection des formes actives de MMP au sein de protéomes complexes.

II. 3. Principe des sondes « Activity Based Probe »

L'ensemble des approches mentionnées ci-dessous ont pour objectif principal de tester la présence de formes actives des MMP dans des fluides biologiques ou bien dans des tissus prélevés. Ces outils n'ont pas vocation à être utilisés *in vivo*, mais servent surtout à aborder la mesure du niveau d'expression d'une protéase en conditions pathologiques ou bien à établir la capacité d'un inhibiteur à atteindre sa cible *in vivo* dans un animal modèle, dans un test de détection *ex vivo*. Afin d'aborder ces aspects, le groupe de Cravatt *et al.* a proposé de développer des sondes exploitant la structure des inhibiteurs synthétiques disponibles, qui après modifications adéquates, seraient capables de former un lien covalent, une fois l'interaction sonde/protéase réalisée. Tout l'intérêt de telles sondes, notamment si elles comportent un tag permettant une détection sensible, est de pouvoir détecter et quantifier le niveau d'expression d'une protéase sous forme active exclusivement, même *in vivo*. Dans cette démarche, la sonde peut être soit très sélective pour suivre spécifiquement une cible donnée ou bien peu sélective et permettre d'étudier en parallèle le niveau d'expression d'une sous-famille complète de cibles. De telles sondes ont été désignées sous le terme d'activity-based probe ou ABP. Pouvant servir à réaliser le profil d'expression de différentes protéines, l'utilisation de ces sondes conduit au développement d'une nouvelle technique appelée « activity-based probe profiling » ABPP.

L'approche ABP a donné lieu à des utilisations très importantes et variées, essentiellement lorsque la sonde ABP cible une enzyme possédant un résidu nucléophile pouvant réagir de façon efficace avec une fonction électrophile portée par la sonde. Dans ce cas, comme décrit en Figure 45, la sonde va incorporer trois éléments distincts :

- la composante inhibitrice, capable d'inhiber l'enzyme sous forme active dans laquelle le site actif libre de toute interaction est de spécificité variable selon les objectifs de l'étude.
- une espèce réactive chimique, pouvant générer un lien covalent entre l'enzyme et la sonde.
- une étiquette, détectant le complexe covalent enzyme-sonde. Cette étiquette peut être un groupement fluorescent, un élément radioactif ou une étiquette d'affinité permettant une capture sélective des protéines modifiées, telle la biotine.



Figure 45 : schéma de principe d'une sonde ABP comportant : une composante inhibitrice (noir), une espèce chimique réactive (violet) et une étiquette (rouge)

Au sein d'un protéome complexe, l'ajout de la sonde ABP conduit au marquage spécifique des formes actives libres des protéases ciblées (Figure 46). Le complexe covalent enzyme-sonde est révélé sur un gel d'électrophorèse ou sur une membrane PVDF, via l'étiquette présente sur la sonde, en utilisant différentes stratégies de visualisation.

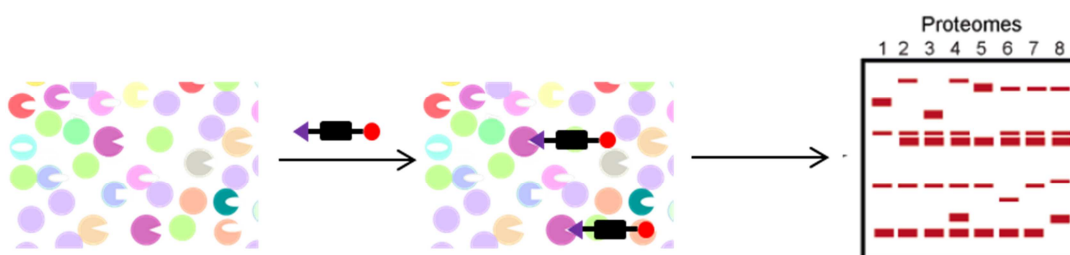


Figure 46 : Représentation schématique d'une expérience classique de marquage avec la sonde ABP¹⁵⁴

Il faut cependant noter que le succès de telles approches dépend du type de protéase étudiée. En effet, les protéases sont classées selon leur mécanisme catalytique : il existe cinq grands types de protéases : les protéases à cystéines, à sérine, à thréonine, à acide aspartique et les métalloprotéases. Les trois premières familles utilisent un acide aminé portant une fonction nucléophile dans leur site actif et se prêtent donc très bien à une modification covalente par une fonction nucléophile portée par la sonde. Pour les protéases à acide aspartique et les métalloprotéases, le nucléophile est une molécule d'eau activée, ne pouvant être utile pour faire un lien covalent. Pour ces protéases, d'autres stratégies doivent être utilisées pour développer des sondes ABP.

Concernant les protéases à cystéine, à sérine ou à thréonine, plusieurs sondes ABP ont été élaborées. Certaines utilisent la réactivité des groupements fluorophosphonates, très largement exploités pour le marquage des sérines hydrolases.^{155,156,157} Par exemple, Liu *et al.*¹⁵⁵ ont démontré qu'une sonde fluorophosphonate contenant un groupement rapporteur de type biotine (Figure 47) était capable de modifier de façon covalente les sérines hydrolases.

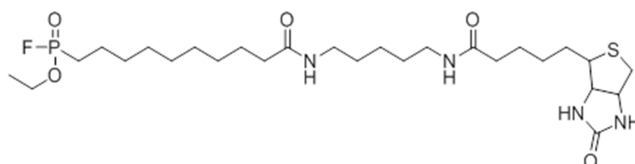


Figure 47 : structure chimique des sondes fluorophosphonates contenant un groupement biotine pour le marquage des sérines hydrolases, développée par Liu *et al.*¹⁵⁵

En effet, cette sonde ABP (utilisée à une concentration finale de 2 μ M) modifie l'amide hydrolase d'acides gras (fatty acid amide hydrolase, FAAH) de façon dépendante de son activité. De plus, la protéine inactive contenant la mutation de la sérine 241 (impliquée dans l'acte catalytique) n'est pas marquée par la sonde (Figure 48A), ce qui démontre que le marquage est effectivement spécifique de la protéine active.

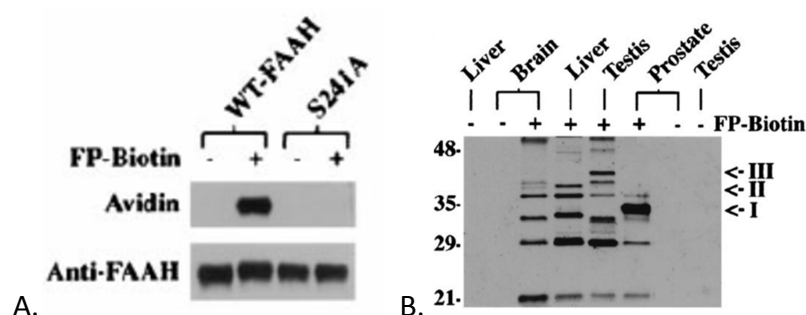


Figure 48 : A. marquage de la FAAH et absence de marquage du mutant S241A B. marquage des protéines présentes dans les extraits d'organes de rat (fraction soluble 1 μ g/ μ L, 10 μ g déposés) avec la sonde biotine (2 μ M)

Par ailleurs, la sonde biotinylée est à la fois capable de marquer plusieurs protéines issues de lysats cellulaires de cellules HEK-293, transfectées avec l'ADN de la protéine FAAH, mais aussi de marquer des protéines présentes dans des extraits d'organes de rats (Figure 48B). Ainsi, la protéine I de 33 kDa, identifiée exclusivement dans la prostate pourrait être un homologue fonctionnel à l'antigène spécifique de la prostate, identifié chez l'homme.¹⁵⁵

Plus récemment, toujours dans l'étude de la FAAH, Cravatt *et al.*¹⁵⁸ ont utilisé un inhibiteur covalent *in vivo* qui atteint sa cible, et de façon sélective. Pour ce faire, après s'être assuré que l'inhibiteur URB597 modifiait de façon covalente la sérine nucléophile de la FAAH par spectrométrie de masse, un analogue alcyne (JP104) a été synthétisé (Figure 49).

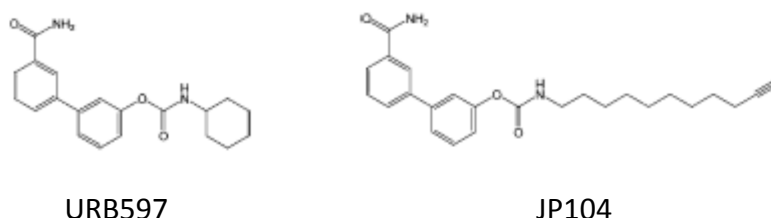


Figure 49 : structure des inhibiteurs URB597 et son analogue alcyne JP104¹⁵⁸

L'objectif de ce travail était d'injecter directement *in vivo* différentes concentrations de l'analogue alcyne, de récupérer les organes, les homogénéiser, et d'ajouter une étiquette

Rhodamine-azoture, capable de réagir par chimie « click » sur l'alcyne de l'inhibiteur. La présence de l'inhibiteur était ensuite observée après une étape de séparation sur gel d'électrophorèse des protéines présentes dans les homogénats d'organes. La révélation du gel était réalisée en utilisant un scanner spécifique du groupement fluorescent (Figure 50).

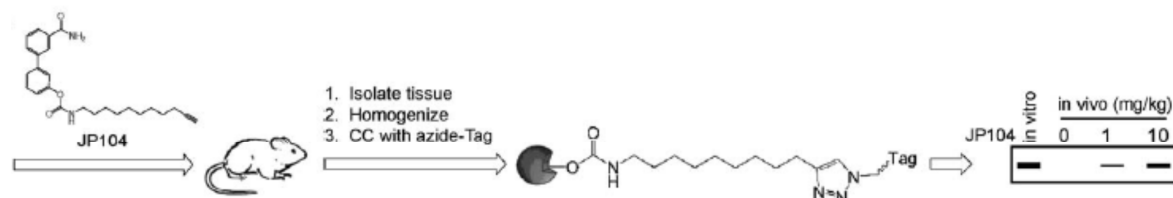


Figure 50 : schéma de principe de l'étude réalisée par Cravatt *et al.* pour l'étude *in vivo* de l'utilisation de l'inhibiteur JP104¹⁵⁸

Cette approche a en effet permis de marquer une protéine dans le cerveau des souris. L'absence de marquage de cette protéine dans les cerveaux des souris FAAH^{-/-} montre effectivement que la protéine pourrait correspondre à la cible. De plus, l'intensité de ce marquage était dépendante de la dose d'inhibiteur injectée. Par ailleurs, cette sonde, sélective pour la FAAH dans le système nerveux, a aussi été capable de marquer d'autres protéines dans des tissus périphériques : la sonde ainsi développée a donc cibler la protéine cible (FAAH) dans les cerveaux des souris. Une des raisons de ce succès provient aussi de l'emploi d'une technique en deux temps, permettant de s'affranchir du groupement fluorescent, stériquement encombrant et hydrophobe, pendant l'étape de marquage. Ainsi les interactions non-spécifiques ont été limitées.

D'autres types de groupements ont été utilisés pour des sondes ABP. Les groupements acyloxyméthylcétone¹⁵⁹, les diazométhylcétone¹⁶⁰, les époxydes¹⁶¹ et les sulfones vinyliques ont aussi été exploités pour synthétiser des sondes capables de modifier des protéases à cystéines.^{162,163,164}

Bogyo *et al.*¹⁶⁵ ont développé une sonde ABP capable de visualiser *in vivo* l'activité protéolytique de la légumine, une protéase à cystéine lysosomale. La sonde développée (LP-1) possède un groupement fluorescent Cyanine 5 et un groupement époxyde réactif (Figure 51).

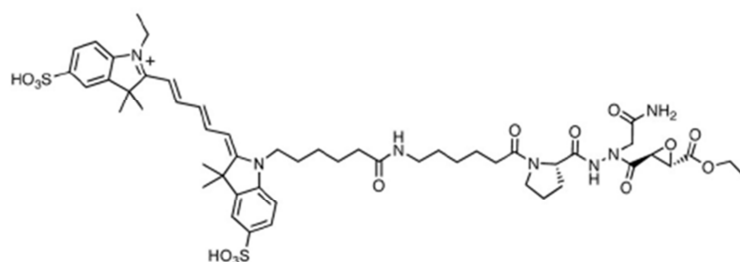


Figure 51 : structure chimique de la sonde LP-1 portant un groupement époxyde réactif, un groupement fluorescent Cyanine 5¹⁶⁵

L'IC₅₀ de l'inhibiteur correspondant à cette sonde (ne portant pas le groupement fluorescent Cyanine 5) est de 11 nM pour la légumaine, tandis que son affinité est supérieure à 100 µM pour les cathepsines B et L et la caspase-3. Dans un premier temps, cette sonde (1 µM) a été utilisée sur des cellules intactes de macrophages RAW 264.7 et de cellules NIH-373. Les protéines marquées par la sonde fluorescente, présentes dans les lysats cellulaires, ont ensuite été analysées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE. La légumaine apparaît comme la principale protéine marquée par cette sonde, validant ainsi son utilisation sur cellules entières. Pour aller plus loin dans l'étude et suivre l'activité protéolytique de la légumaine *in vivo*, des souris xénogreffées avec des tumeurs C2C12/Hras ont été placées dans un imageur fluorescent, suite à l'injection de sonde LP-1 (25 nmol dans 100 µL de PBS). Le signal observé a été suivi pendant 5 h d'acquisition. La spécificité du signal enregistré a été validée par la comparaison avec des souris contrôles, dans lesquelles une sonde fluorescente ne portant pas le groupement époxyde (donc inapte à créer un lien covalent, LP-1 Ctrl) a été injectée. On observe ainsi que la sonde LP-1 s'accumule rapidement dans les tissus tumoraux, tandis que la sonde contrôle non-covalente (LP-1 Ctrl) ne montre pas cette accumulation (Figure 52). De plus, l'étude des organes par gel d'électrophorèse SDS-PAGE, confirme la présence de protéines marquées de façon intense, dont le poids moléculaire correspond à celui de la légumaine. Ces travaux montrent ainsi qu'il est dorénavant possible de suivre le marquage *in vivo* de certaines protéases avec des ABP fluorescentes.

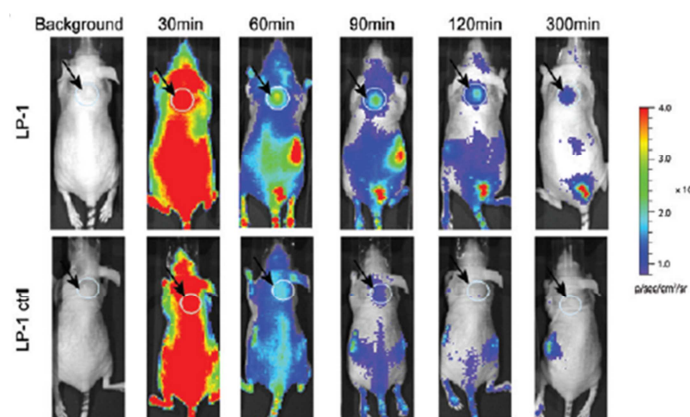


Figure 52 : comparaison du marquage *in vivo* avec la sonde LP-1 et tLP-1. marquage de souris portant des xénogreffes de tumeurs C2C12/Hras, injectées avec la sonde LP-1 et LP-1 Ctrl¹⁶⁵

II. 4. Principe du marquage par photoaffinité

Les MMP utilisent une molécule d'eau activée par l'atome de zinc pour réaliser l'attaque nucléophile sur leur substrat lors de l'acte catalytique. A l'inverse des protéases à cystéines ou des sérines hydrolases, il est impossible d'exploiter la présence d'un résidu nucléophile intervenant dans l'acte catalytique pour concevoir une sonde « activity-based probe ».

Afin de former un lien covalent stable, un photomarquage d'affinité peut être envisagé en fonctionnalisant la sonde avec un groupement photoactivable capable de générer, sous irradiation UV, un intermédiaire hautement réactif qui formera un lien covalent entre l'enzyme et la sonde. (Figure 53)

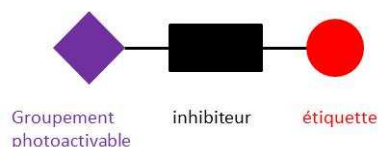


Figure 53 : schéma de la sonde ABP photoactivable comportant un groupement photoactivable (violet), un inhibiteur (noir), une étiquette (rouge)

Contrairement aux ABP, le marquage avec les sondes photoactivables se réalise en deux temps. Tout d'abord, l'inhibiteur photoactivable forme un complexe d'affinité avec sa cible. Une fois ce complexe formé, l'irradiation UV permet la formation d'espèces très réactives capables de générer le lien covalent entre l'enzyme et la sonde (Figure 54).

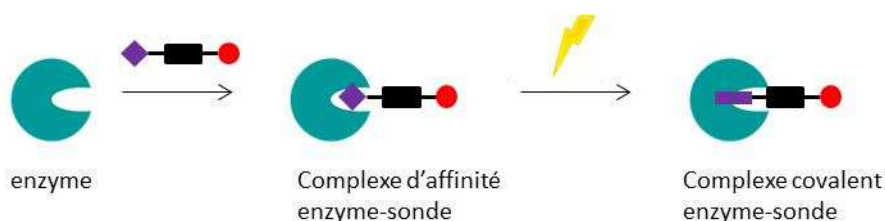


Figure 54 : expérience de photomarquage d'affinité : formation du complexe d'affinité puis irradiation UV pour former le complexe covalent enzyme-sonde

Une des difficultés majeures du marquage de photoaffinité réside dans le rendement de marquage des protéines cibles, pouvant varier de 0,1 % (voire moins) à plus de 10 % dans des cas favorables. Il est nécessaire de dissocier chacune des deux étapes précédemment citées. L'affinité de la sonde module la formation du complexe d'affinité, elle dictera donc les concentrations de sonde à utiliser pour former 100 % de complexe entre la sonde et les protéines cibles. Pour la formation du lien covalent, le groupement photoactivable doit ensuite réagir au sein du site actif de la protéine avec un ou des résidus de la protéine. Or, la sonde est très souvent entourée de nombreuses molécules d'eau au sein de la protéine, pouvant elles aussi réagir avec les espèces formées sous irradiation UV, entraînant un échec dans le marquage du complexe enzyme-sonde.

II. 5. Application du marquage par photoaffinité pour les MMP

Dans le cas des MMP, diverses approches de marquage par photoaffinité ont été réalisées à l'aide des groupements photoactivables usuels : les azotures¹⁶⁶, les benzophénones ou les diazirines.^{167,168,169} Chacun de ces groupements photoactivables est

capable de générer après irradiation UV une autre espèce chimique très réactive (respectivement des nitrènes, des radicaux ou des carbènes), de durée de vie très faible, apte à former des liaisons covalentes avec les molécules de son environnement.

Pour être utilisable dans les milieux biologiques, les groupements photoactivables employés doivent obéir à plusieurs critères :^{170, 171}

- ils doivent être initialement stables dans l'eau et dans le milieu biologique étudié
- ils ne doivent s'activer qu'après irradiation à une longueur d'onde spécifique, qui n'endommage pas les protéines présentes dans l'échantillon ($\lambda > 300$ nm)
- l'espèce réactive formée suite à l'irradiation doit avoir une durée de vie plus courte que celle du complexe enzyme-sonde étudié, de façon à limiter les interactions non-spécifiques
- l'espèce réactive doit pouvoir réagir avec les liaisons chimiques de son environnement proche, y compris des liaisons carbone-hydrogène, souvent peu réactives
- l'adduit covalent formé doit être stable
- la taille et la position du groupement photoactivable introduit ne doit pas perturber l'interaction de l'inhibiteur avec sa cible.

Afin de replacer ces différents groupements photoactivables dans le contexte structural des MMP, il est nécessaire de prendre en compte la présence de la cavité S_1' . En effet, les groupements photoactivables étant souvent stériquement encombrants, leur positionnement dans la structure de l'ABP a une influence importante sur l'affinité et sur la formation du lien covalent entre l'enzyme et la sonde.

II. 5. a) Groupement benzophénone

Lors de l'irradiation à 350 nm de la benzophénone, un électron de l'orbitale n non liante de l'oxygène est excité dans une orbitale π^* du carbonyle¹⁷², ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire diradical triplet dont la durée de vie est de 80 μ s à 120 μ s maximum. Dans ce diradical, l'orbitale n de l'oxygène, déficiente en électron, interagit avec les faibles liaisons C-H de type σ dans son environnement immédiat, par arrachement d'un radical hydrogène d'une amine NC-H (ou un hétéroatome similaire), pour former deux espèces radicalaires (étape 1, Figure 55). Cette étape 1 est l'étape cinétiquement déterminante. Dans une seconde étape, les deux radicaux réagissent très rapidement entre eux pour former le lien covalent (étape 2, Figure 55).

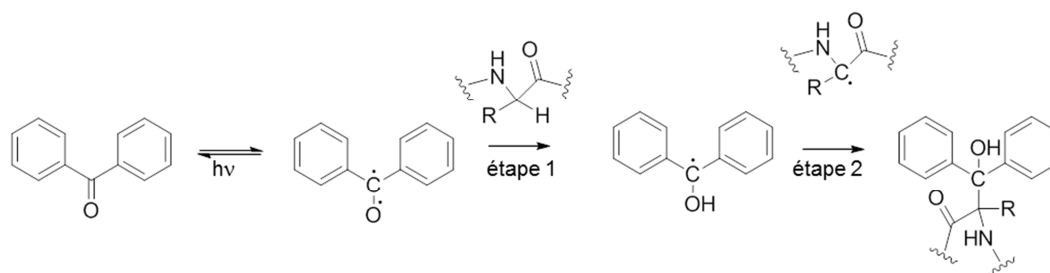


Figure 55 : mécanisme de la photactivation de la benzophénone

L'étape de formation du diradical est une étape réversible : l'augmentation du temps d'irradiation améliore le rendement de marquage, en déplaçant la réaction vers la formation de l'adduit covalent. Par ailleurs, le diradical peut réagir avec l'eau mais la molécule obtenue peut subir une déshydratation pour former à nouveau la benzophénone (Figure 56). En cas de ligand de faible affinité, l'excès de sonde peut réagir de façon non spécifique avec d'autres molécules ou protéines présentes dans le milieu. De façon générale, le diradical est plus réactif avec les liaisons C-H qu'avec les liaisons O-H.

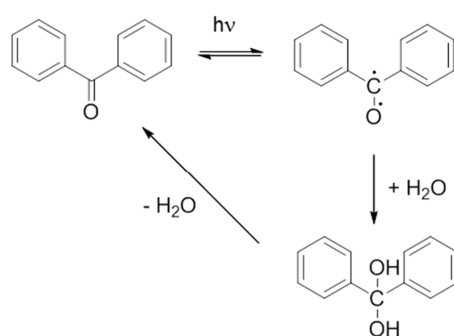


Figure 56 : réaction secondaire du diradical sur une molécule d'eau

D'un point de vue synthétique, de nombreux composés commerciaux possédant une benzophénone sont disponibles, ce qui facilite l'accessibilité à ce type de molécules. Cependant, le temps d'irradiation nécessaire pour le marquage covalent est souvent supérieur à 30 minutes, il est donc essentiel de refroidir les échantillons durant l'étape de photoactivation afin d'éviter une dégradation des protéines. De plus, l'encombrement stérique de la benzophénone est assez important, pouvant diminuer l'affinité de la sonde pour sa cible.

Rosenblatt *et al.* ont démontré que la benzophénone interagissait préférentiellement avec les méthionines des cibles protéiques, et plus précisément le groupement méthyle de la chaîne latérale.¹⁷³ D'autres études ont montré que la valine, la leucine ou la proline peuvent aussi réagir avec les benzophénones, en cas de proximité spatiale avec le groupement réactif.¹⁷⁴

La synthèse d'une sonde ABP hydroxamate HxBP-Rh (Figure 57), portant un groupement benzophénone, a été réalisée par l'équipe de Cravatt.¹⁷⁵ Elle comprend trois parties différentes :

- une composante inhibitrice dérivée du Marimastat, un inhibiteur large spectre des MMP, comportant un groupement hydroxamate, chélatant de l'atome de zinc (en noir)
- une étiquette fluorescente : la rhodamine (en rouge)
- un groupement photoactivable : la benzophénone (en violet)

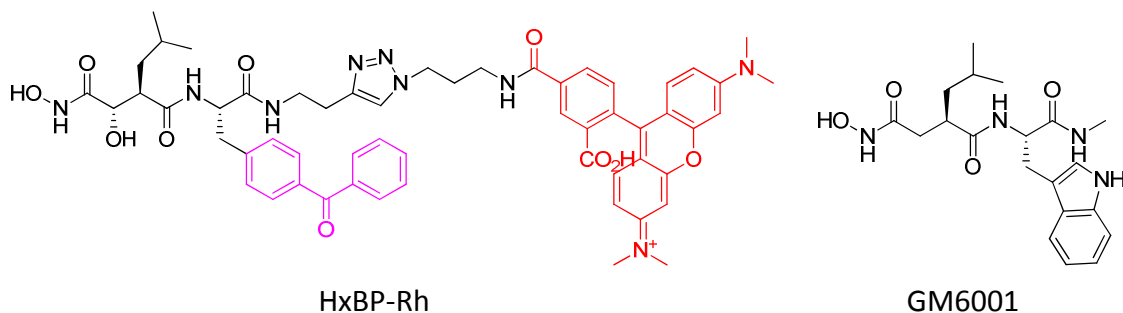


Figure 57 : structure chimique de la sonde HxBP-Rh utilisée par le groupe de Cravatt et structure de l'inhibiteur GM6001

La sonde HxBP-Rh a une constante d'inhibition de 13 nM, de 135 nM et de 13 nM, vis-à-vis des hMMP-2, hMMP-7 et hMMP-9 respectivement. Le marquage de formes actives de hMMP-2 (30 ng) par cette sonde (100 nM) est réalisé en tampon. De plus, dans une expérience de compétition en présence du GM6001 (inhibiteur large spectre des MMP), l'absence de signal correspondant à la hMMP-2 montre que le marquage est spécifique de son site actif. Par ailleurs, la sonde ne marque pas la proforme de la hMMP-2. Tous ces éléments valident donc son utilisation en tant qu'ABP capable de marquer les formes actives recombinantes de la hMMP-2.

Afin de tester les capacités de la sonde en milieu complexe, elle a été employée pour modifier de façon covalente chacune des hMMP-2, hMMP-7 et hMMP-9 (100 ng) recombinantes, ajoutée dans un protéome complexe issu de rein de souris (15 µg de protéines totales). La sonde permet alors de détecter 0,6 % de protéines spécifiques au sein de ce protéome (Figure 58C). La limite de détection pour la hMMP-2 (3 ng, 60 fmol) avec cette sonde est de 3 nM dans un protéome complexe (15 µg), soit de 0,02 % des protéines totales (Figure 58B).

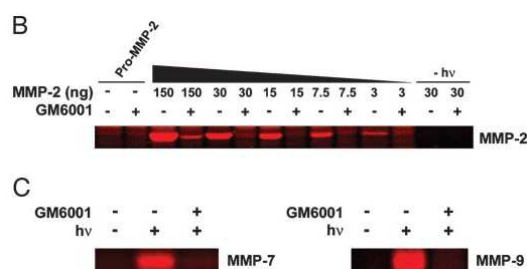


Figure 58 : marquage de MMP exogène dans un protéome de rein de souris. B. sensibilité de détection de la hMMP-2 dans le protéome complexe. C. marquage de la hMMP-7 et hMMP-9 dans le protéome complexe¹⁷⁵

De plus, le fait que le marquage d'une forme recombinante de MMP soit possible montre l'absence d'inhibiteurs naturels dans ce milieu (Figure 59). Une autre expérience de compétition (en présence de l'inhibiteur GM6001 ou du TIMP-1) sur la hMMP-2 recombinante ajoutée dans ce milieu démontre que ce marquage en milieu complexe est spécifique de la MMP. Il est à noter que la sonde marque deux autres métalloprotéases au sein de ce protéome : la leucine aminopeptidase (LAP) et la dipeptidylpeptidase III (DPPIII) dont les signaux sont inhibés par l'inhibiteur hydroxamate GM6001.

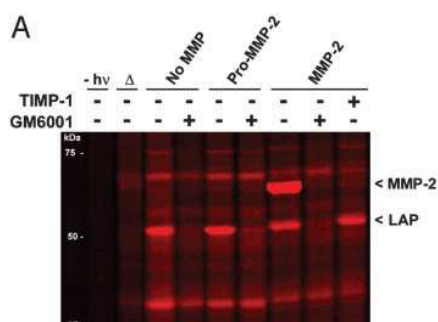


Figure 59 : A. marquage de la hMMP-2 exogène dans un protéome de rein de souris¹⁷⁵

En présence de lignées cellulaires humaines de mélanomes invasifs (MUM-2B et C-8161), la sonde marque de nombreuses protéines. Cravatt *et al.* ont ainsi montré une surexpression de néprilysine (métalloprotéase) dans les lignées de mélanome invasif par rapport à des lignées non-invasives (MUM-2C, M14-Mel et UACC-62).

De façon intéressante, cette sonde est donc capable de modifier plusieurs MMP recombinantes ajoutées à ce milieu complexe. Cependant, elle n'a pas permis la détection de formes endogènes de MMP, pourtant exprimées dans les mélanomes, mais elle a marqué d'autres cibles, des métalloprotéases qui ne sont pas des MMP et dont les structures sont très différentes des MMP et entre elles. De plus, on peut noter que le marquage observé avec la sonde fluorescente conduit à un bruit de fond important, lié à un marquage non-spécifique de protéines. Une raison possible à cette absence de spécificité de marquage est liée aux rapports de concentration entre les MMP et les autres protéases à zinc. En effet, si la spécificité de la sonde n'est pas assez importante, les MMP ne seront pas observées car la

sonde est piégée par les autres protéases à zinc, présentes plus abondamment. Un autre élément non discuté dans ce travail est lié aux rendements de modification covalente. En effet, si la sonde a un faible rendement de modification covalente pour certaines MMP, elle aura d'autant plus de difficultés à marquer celles-ci, en tampon ou en milieu complexe.

Cravatt *et al.*¹⁷⁶ ont ensuite conçu une deuxième génération de sonde sans étiquette fluorescente, afin de limiter les interactions non spécifiques dues aux groupements fluorescents assez encombrants. Ils ont ainsi réalisé une chimiothèque de sondes peptidiques HxBPyne dérivées du Marimastat et de l'Ilomastat portant un groupement alcyne, détectable dans une seconde étape par une Rhodamine-azoture, qui réagit sur l'alcyne par réaction de cycloaddition de Huisgens pour former un triazole. Les sondes ainsi développées sont utilisables pour la détection des métalloprotéases (Figure 60).

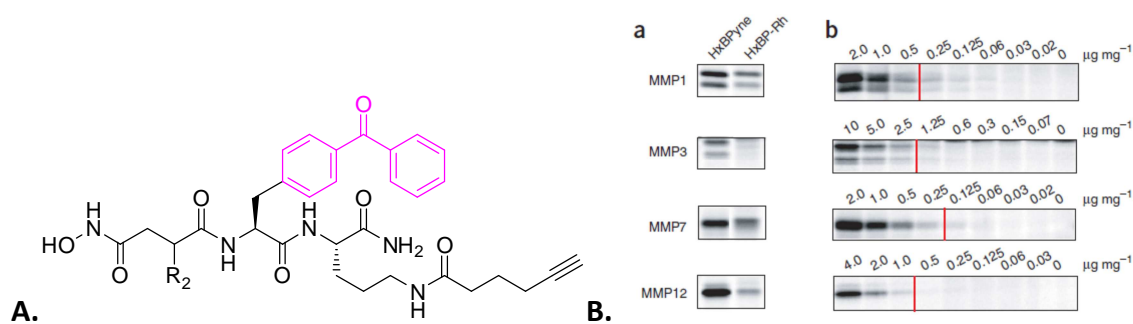


Figure 60 : A. structure générale des sondes HxBPyne utilisées pour la détection des formes actives des MMP par Cravatt *et al.* B. Comparaison du marquage des hMMP1/ hMMP3/ hMMP7/ hMMP12 avec la sonde HxBPyne R₂ = Leu et la sonde HxBP-Rh¹⁷⁶

Il est à noter que la détection des hMMP-1, hMMP-3, hMMP-7, hMMP-12 est améliorée avec la sonde HxBPyne (où R₂ = Leu) par rapport à la sonde HxBP-Rh précédemment citée (Figure 60), ce qui montre l'impact négatif de la présence du fluorophore pour l'efficacité de marquage. En milieu complexe, la sonde HxBPyne a une limite de détection entre 0,25 μg et 2,5 μg par milligramme de protéines totales pour les quatre MMP testées, soit 0,25 % à 0,025 % des protéines totales, ce qui est proche de la sensibilité obtenue avec la sonde fluorescente pour la hMMP-2. Il n'est cependant pas certain que cette sensibilité de détection des MMP soit suffisante pour marquer des formes endogènes de MMP. En outre, cette sonde est très probablement non sélective des MMP à cause de la présence d'un groupement chélatant de type hydroxamate. En effet, il est vraisemblable qu'en milieu complexe, elle se fixe sur les métalloprotéases présentes en quantité importante dans le milieu et qu'elle serait ainsi dans l'incapacité de marquer les MMP présentes en quantités beaucoup plus faible.

Utilisant eux aussi une sonde benzophénone, Wang *et al.*¹⁷⁷ ont synthétisé une petite chimiothèque de 12 sondes ABP possédant un groupement hydroxamate pour la détection des MMP (Figure 61).

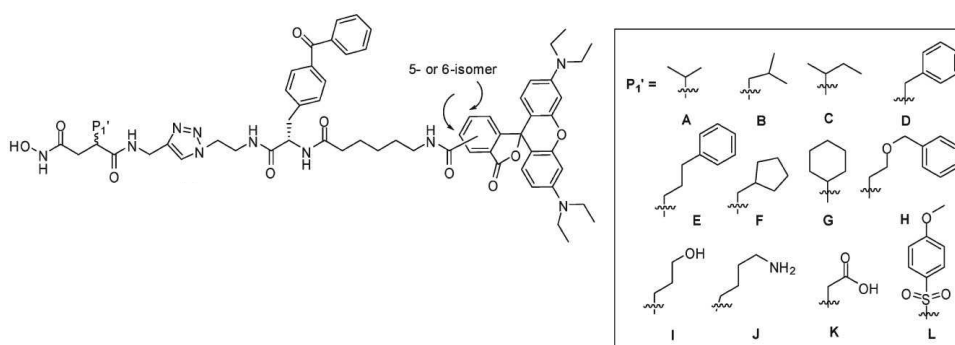


Figure 61 : structure chimique des 12 sondes développées par Wang *et al.*

La détection des MMP-3 (10 ng), MMP-7 (96 ng) et MMP-14 (30 ng) a été réalisée avec ces sondes, qui détectent aussi d'autres métalloprotéases, comme la thermolysine. En présence de lysat cellulaire, la thermolysine recombinante est aussi marquée par la sonde B ($P_1' = \text{Leu}$). Ainsi, ces sondes ne permettent donc toujours pas une détection spécifique des MMP en milieu complexe.

II. 5. b) Groupement trifluorométhylphényldiazirine

Parmi les diazirines, les groupements trifluorométhylphényldiazirines apparaissent comme les plus stables chimiquement et thermiquement, entraînant peu de réarrangements intramoléculaires par rapport à d'autres diazirines. Elles ont ainsi été largement exploitées pour le marquage de protéines par photoaffinité. Cependant, ce sont des molécules assez encombrées, il convient donc d'étudier leur positionnement au sein de la sonde afin de limiter les interférences dans l'affinité de la sonde pour sa cible.

Les acides aminés modifiés par les carbènes issus des groupements trifluorométhylphényldiazirines sont très variés : méthionine, sérine, glycine, valine, asparagine, isoleucine, phénylalanine, cystéine.^{178,179}

Sous irradiation à 350 nm, les trifluorométhylphényldiazirines forment des carbènes singulets hautement réactifs, issus de la perte d'une molécule d'azote par la diazirine (Figure 62). Ces carbènes réagissent ensuite par un mécanisme d'insertion au sein d'une liaison X-H, où X peut être un carbone ou un hétéroatome. Leur réactivité d'insertion au sein de nombreuses liaisons (C-H, O-H, C-C, C-X = hétéroatome), y compris les liaisons C-H souvent peu réactives, est un avantage majeur des diazirines.

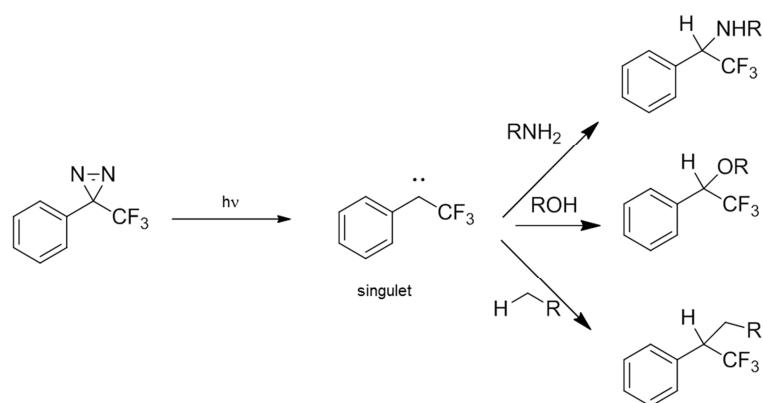


Figure 62 : schéma de la réactivité du carbène singulet après irradiation UV

Dans le cas d'une réaction du carbène singulet avec une amine primaire ou secondaire, une réaction secondaire possible provient de la formation d'une énamine, suite à la perte de HF (Figure 63). En milieu aqueux l'imine peut se réarranger pour former une cétone, qui conduit à l'échec du marquage de la cible par le groupement photoactivable par hydrolyse du lien covalent.

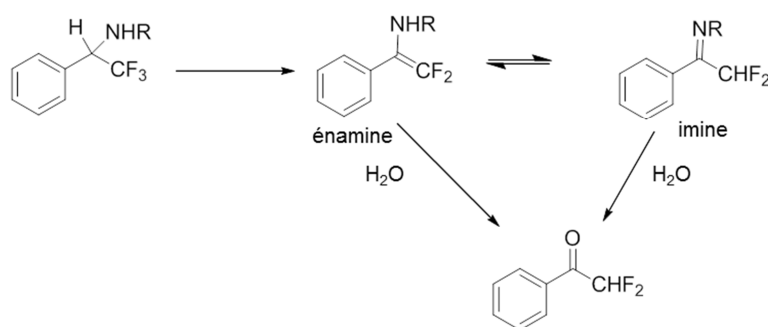


Figure 63 : réaction secondaire suite à l'insertion d'une amine primaire ou secondaire

Les carbènes singulets peuvent aussi subir un croisement intersystème en carbènes triplets qui réagissent pour former des radicaux (Figure 64).

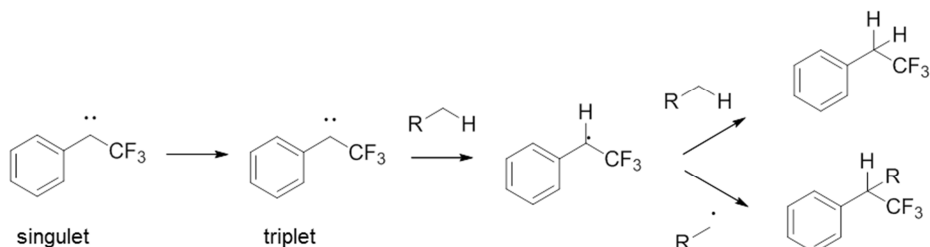


Figure 64 : réactivité du carbène triplet

L'arrachement d'un hydrogène conduit à la formation de deux espèces radicalaires. L'espèce radicalaire peut ensuite soit réagir pour à nouveau réaliser un arrachement d'un hydrogène, soit réagir avec l'espèce radicalaire initialement formée.

Une autre réaction secondaire possible provient de l'oxydation par le dioxygène du carbène triplet pour former une cétone, ce qui conduit à l'échec du marquage.

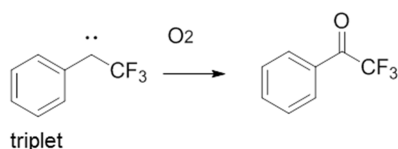


Figure 65 : réaction secondaire du carbène triplet sur le dioxygène conduisant à une cétone

Le groupement trifluorométhylphényldiazirine a été utilisé pour la synthèse de sondes capables de marquer les MMP. La première équipe utilisant ce groupement dans ce but est l'équipe de Yao,¹⁸⁰ qui propose deux sondes hydroxamates analogues dans leur structure (possédant une étiquette fluorescente Cyanine 3), portant soit un groupement photoactivable trifluorométhylphényldiazirine soit un groupement benzophenone (Figure 66A). Avec 500 nM de la sonde diazirine, il est possible de modifier jusqu'à 5 ng de thermolysine et 1 ng de la hMMP-9. Avec une quantité de sonde diazirine supérieure à 5 µM, bien que le marquage de la thermolysine soit amélioré, le marquage d'autres protéases telles la papaine, la trypsine ou la cathepsine D est observé, montrant ainsi que la quantité de sonde est un élément important dans la spécificité du marquage.

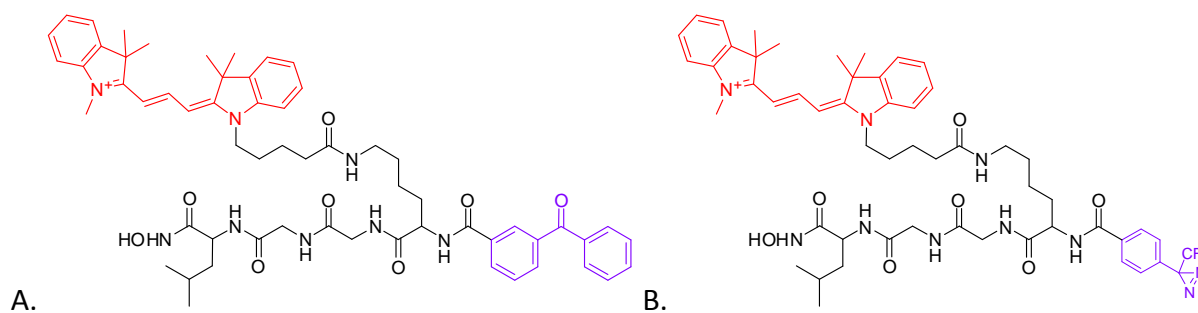


Figure 66 : structure des sondes hydroxamates développée par Yao *et al.* pour la détection de métalloprotéases A. sonde trifluorométhylphényldiazirine B. sonde benzophénone¹⁸⁰

La comparaison du marquage de 10 µg de thermolysine en milieu complexe (extrait de levures, 100 µg) avec les deux sondes révèle qu'à quantités égales en protéines et en présence de 5 µM de chaque sonde, seule la sonde diazirine est capable de marquer la thermolysine. Cette différence de réactivité des groupements photoactivables est globalement en faveur de la diazirine pour le marquage en milieu complexe.

La sonde diazirine a donc une bonne sensibilité pour la détection de la hMMP-9, mais elle n'est pas spécifique de cette sous-famille des métalloprotéases. La question de l'efficacité de cette sonde pour le marquage de MMP endogènes n'est pas abordée, mais là

encore, la capacité de la sonde à modifier des métalloprotéases présentes en quantité importante peut peut-être nuire au marquage spécifique des MMP endogènes, présentes en très faible quantité.

Les équipes d'Overkleeft et de Bischoff^{181,182} ont eux aussi travaillé sur la synthèse de sondes hydroxamates comportant un groupement photoactivable de type trifluorométhylphényldiazirine et une étiquette biotine, capables de modifier la famille des MMP et des ADAM. Dans un premier travail, ils ont comparé l'efficacité de deux sondes possédant le groupement photoactivable soit en position P₁' soit en position P₂' pour la modification covalente des MMP et des ADAM (Figure 67).

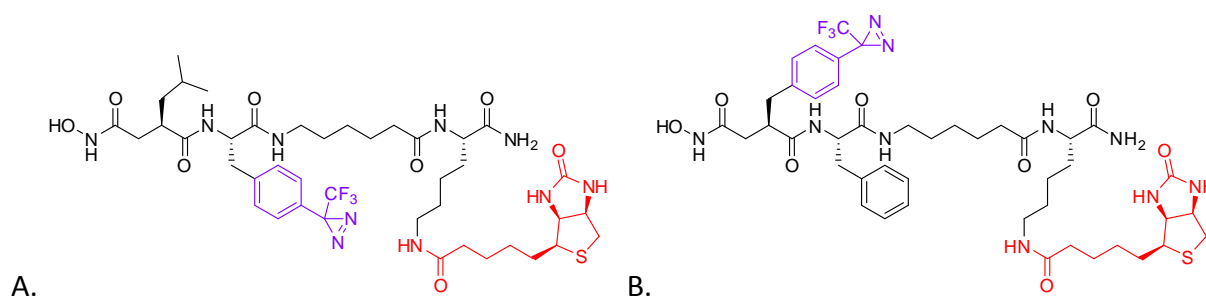


Figure 67 : A. sonde photoactivable A comportant le groupement photoactivable en position P₂'. B. sonde photoactivable B comportant le groupement photoactivable en position P₁'

Bien que les affinités des sondes A et B vis-à-vis des MMP soient très proches (respectivement 25,1 nM et 24,2 nM vis-à-vis de la MMP-9 et 3,6 nM et 12,5 nM vis-à-vis de la MMP-12), la sonde B s'avère plus efficace que la sonde A pour marquer les différentes MMP et ADAM testées (Figure 68).

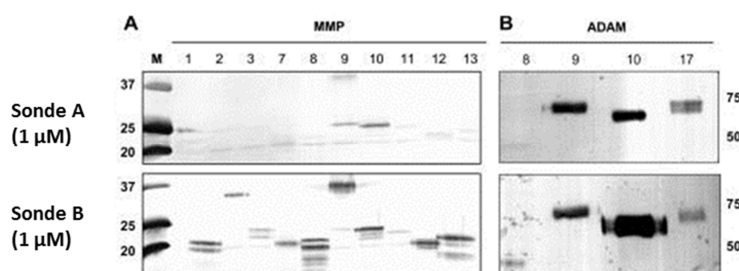


Figure 68 : comparaison du marquage des MMP et ADAM avec les sondes photoactivables A et B (dépôt entre 80 à 150 ng)

On peut remarquer cependant que les marquages entre les différentes MMP ne sont pas homogènes : les MMP-1, MMP-3 et MMP-11 sont très faiblement marquées par cette sonde, tandis qu'au contraire, les MMP-8, MMP-12 et MMP-13 sont plus fortement marquées.

De façon globale, l'amélioration des rendements de modification covalente due à la présence du groupement photoactivable en position P₁' peut s'expliquer par la particularité

structurale des MMP. Dans la cavité hydrophobe en position S_1' , le carbène formé par l'irradiation de la diazirine est probablement moins amené à rencontrer des molécules d'eau. Il réagit donc préférentiellement avec les résidus de la boucle S_1' de l'enzyme pour former un complexe covalent.

Même si cette sonde est effectivement capable de marquer un très large panel de MMP et plusieurs ADAM, permettant la détection de ces deux sous-familles de métalloprotéases, la sonde développée possède, une fois encore, un groupement chélatant du zinc de type hydroxamate. Elle pourrait donc avoir des difficultés à détecter des MMP en milieux complexes à cause d'interactions non spécifiques dues à un marquage d'autres métalloprotéases.

Un dernier exemple pour la conception d'une sonde ABP pour la modification covalente des MMP a été élaboré par l'équipe de Qiu *et al.*¹⁸³ Les auteurs ont en effet synthétisé des analogues trimodulaires du Marimastat (inhibiteur large spectre des MMP) contenant : une composante inhibitrice hydroxamate large spectre des MMP dérivée du marimastat, un groupement photoactivable trifluorométhylphényldiazirine et un groupement 2-azidoacétyle permettant la détection dans une deuxième étape. En effet, après ajout de sonde, le marquage est réalisé ensuite avec une biotine-alcyne, via une réaction de cycloaddition de Huisgens. Cette approche, initialement développée dans les travaux de Cravatt *et al.*, a l'avantage de ne pas perturber l'interaction entre l'inhibiteur et la protéine avec des groupements fluorescents assez encombrants (Figure 69).

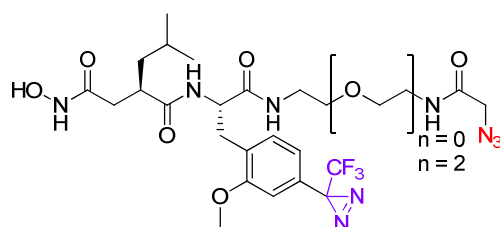


Figure 69 : structure des deux sondes trimodulaires de Qiu *et al.*¹⁸³ comprenant : une composante inhibitrice dérivée du Marimastat, un groupement photoactivable de type trifluorométhylphényldiazirine et un groupement 2-azidoacétyle pour la détection via une cycloaddition de Huisgens avec la biotine-alcyne

Les deux sondes (sonde 1 et sonde 2 avec respectivement $n = 0$ ou $n = 2$) possédant un bras espaceur entre le groupement 2-azidoacétyle plus ou moins long, ont une affinité de 180 nM pour le domaine catalytique de la hMMP-2. La sonde 2 modifie mieux le domaine catalytique de la hMMP-2 que la sonde 1, suggérant qu'un espaceur plus important entre le groupement photoactivable et l'azidoacétyle favorise le rendement de marquage. Cependant, la limite de détection de la sonde 2 est de 80 nM (1,5 ng/ μ L) pour le domaine catalytique de la MMP-2h, ce qui correspond à une concentration encore assez élevée en enzymes. La sonde 2 a été utilisée sur des cellules B16F10 et sur les protéines précipitées dans du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puis les échantillons ont été analysés par Western Blot avec un anticorps

anti-hMMP-2 et par une révélation en anti-HRP streptavidine, apte à révéler la présence de biotine dans l'échantillon. Les auteurs observent le marquage important d'une protéine qu'ils attribuent à la MMP-2 sous forme active. De façon très étonnante, la question de la sélectivité du marquage n'est pas abordée. En effet, aucune expérience de compétition dans ce milieu n'a démontré la spécificité du signal observé, en western Blot ou avec la streptavidine, alors que la compétition avec le GM6001 sur la protéine recombinante montre que le signal observé n'est que partiellement éteint.

II. 5. c) Groupement azoture d'aryle

Sous irradiation UV à 300 nm, les azotures d'aryle perdent une molécule de diazote pour former un nitrène singulet. Ce nitrène singulet peut subir un croisement intersystème pour former un nitrène triplet (Figure 70).

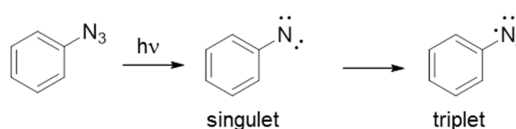


Figure 70 : formation du nitrène singulet après irradiation à 300 nm et formation du nitrène triplet après croisement intersystème

Le nitrène singulet peut réagir en tant qu'électrophile selon un mécanisme d'insertion C-H (Figure 71).

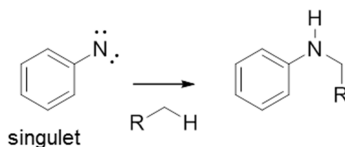


Figure 71 : insertion C-H sur le nitrène singulet

Le nitrène singulet peut aussi se réarranger en benzazirine, qui elle-même peut se réarranger en déhydroazépine. Chacune de ces deux espèces peuvent réagir avec un nucléophile Nu-H (Figure 72).

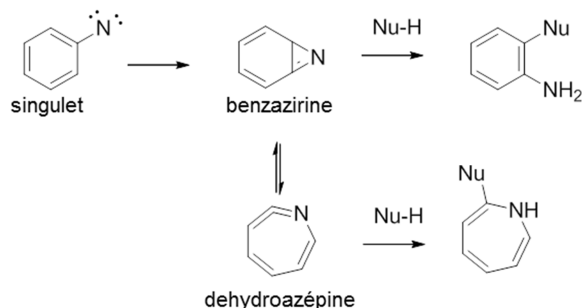


Figure 72 : réarrangement du nitrène singulet en benzazirine, puis en déhydroazépine et attaque nucléophile sur la benzazirine ou sur la déhydroazépine

La réactivité du nitrène triplet passe par des intermédiaires radicalaires. Tout comme les carbènes, l'arrachement d'un hydrogène à une molécule de l'entourage conduit à la formation de deux espèces radicalaires. Celles-ci peuvent réagir entre elles pour former un adduit covalent (Figure 73).

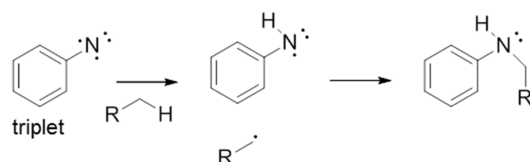


Figure 73 : arrachement d'un hydrogène de la cible protéique et réaction entre les deux radicaux ainsi formés

De façon identique aux carbènes triplets, les nitrènes triplets peuvent s'oxyder en présence de dioxygène (Figure 74).

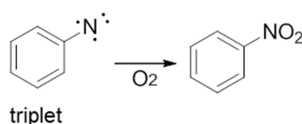


Figure 74: réaction du nitrène singulet sur le dioxygène

Au laboratoire, nous avons développé une sonde azoture capable de détecter les formes actives de MMP humaines. Ces travaux seront détaillés dans la section II.6.

Très récemment Lenger *et al.*¹⁸⁴ ont rapporté la détection de formes actives de MMP isolées de plante (*Arabidopsis thaliana*, At) à l'aide d'une sonde photoactivable dérivée du Marimastat, portant un groupement 4-azidotétrafluorobenzyle. La comparaison d'une sonde benzophénone et d'une sonde 4-azidotétrafluorobenzyle montre que le marquage obtenu avec la sonde azoture est plus efficace (Figure 75).

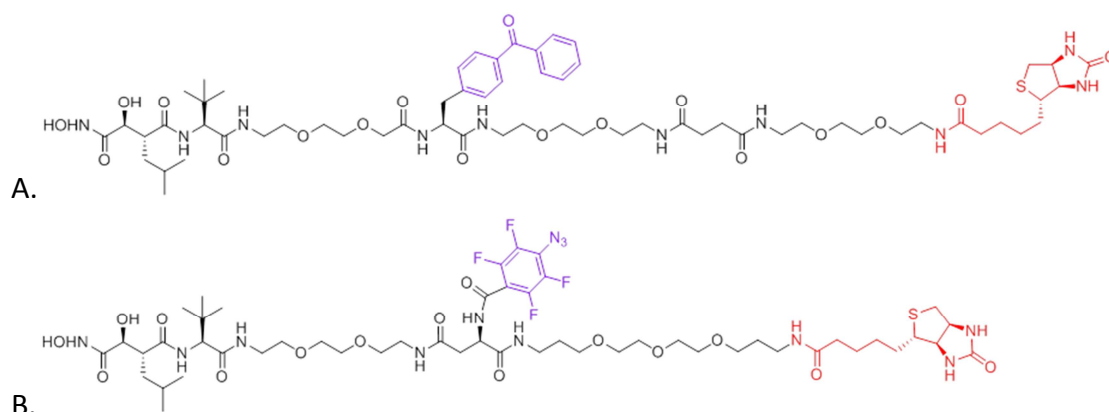


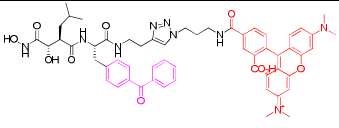
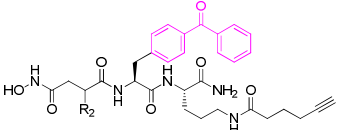
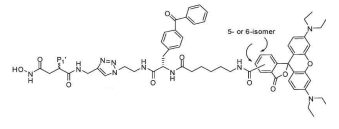
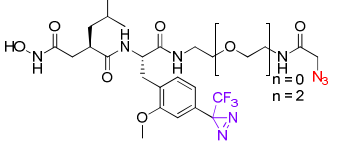
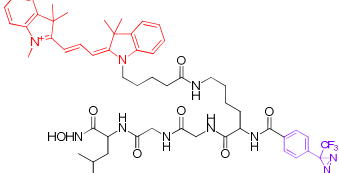
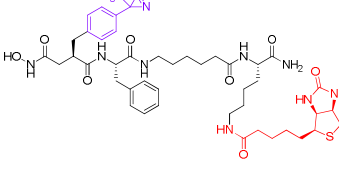
Figure 75 : structure chimique des sondes développées par Lenger *et al.* pour la détection des formes actives dans *Arabidopsis thaliana* A. sonde benzophénone B. sonde 4-azidotétrafluorobenzyle¹⁸⁴

Le marquage des MMP-2, MMP-4 et MMP-5 d'*Arabidopsis thaliana* (respectivement At2-MMP, At4-MMP, At5-MMP) avec la sonde azoture (1 μ M) est réalisé dans des extraits de feuilles de cette plante (1 mg/mL), dans laquelle les vecteurs d'expression de ces MMP ont été clonés afin de conduire à la surexpression de MMP. Ce marquage semble spécifique du site actif de la protéase : suite à une préincubation avec du Marimastat (500 μ M), le marquage diminue fortement. Afin d'identifier les protéines marquées, des expériences de nanoLC-MS ont été réalisées après purification et enrichissement sur des billes de streptavidine et digestion trypsique du complexe covalent enzyme-sonde. Avec la sonde azoture, l'At4-MMP a été identifiée par LC-MS avec 48 % de couverture de séquence et 21 fragments peptidiques identifiés. Cette protéine est présente uniquement dans les extraits de plantes surexprimant les MMP par rapport aux plantes contrôles n'exprimant pas les At-MMP. Pour l'At5-MMP et l'At2-MMP, l'identification par spectrométrie de masse est plus modérée (7 à 8 % de couverture de séquence).

II. 5. d) Bilan des sondes ABP développées dans la littérature pour la détection des formes actives de MMP

Ci-dessous sont présentées les sondes précédemment citées et comparées du point de vue de leur sensibilité pour la détection des MMP, en tampon et en milieu complexe.

Tableau 3 : sensibilité des sondes ABP photoactivables développées dans la littérature pour la détection des formes actives de MMP

Structure chimique de la sonde	Sensibilité en tampon	Sensibilité en milieu complexe	Réf.
	hMMP-2 : 3 ng	Dans 1 µg de protéines de rein de souris : - hMMP-2 : 3 ng - 100 ng pour les hMMP-7 et hMMP-9	175
	-	Dans un protéome de foie de souris : - hMMP-1 : 500 ng/mg de protéines totales - hMMP-3 : 2,5 µg/mg de protéines totales - hMMP-7 : 250 ng/mg de protéines totales - hMMP-12 : 1 µg/mg de protéines totales	176
	- hMMP3 : 10 ng - hMMP-7 : 96 ng - hMMP-14 : 30 ng	-	177
	hMMP-2 : 1,5 ng/µL (80 nM)	-	183
	hMMP-9 : 1 ng	-	180
	hMMP-2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13 : 80 ng à 150 ng	-	181/ 182

Il est intéressant de remarquer que la meilleure sensibilité de détection publiée dans les différentes approches est de 1 ng en tampon pour la hMMP-9 et de 3 ng pour la hMMP-2 en protéome complexe. Sur les différentes sondes reportées, toutes n'ont pas été utilisées en milieu complexe, ce qui pourtant est une étape clef dans la recherche de formes actives endogènes de MMP.

A ce jour, aucune donnée sur une détection de formes actives endogènes issues de fluides biologiques ou d'extraits d'organe n'a été reportée.

II. 6. Travaux antérieurs sur une première génération de sonde ABP

Au laboratoire, une première génération de sonde ABP, précédemment synthétisée pour la détection des formes actives de MMP, est composée de trois éléments :¹⁸⁶

- un groupement photoactivable capable de générer un lien covalent suite à une irradiation à la longueur d'onde d'excitation du groupement choisi
- une composante inhibitrice phosphinique, large spectre des MMP
- une étiquette permettant la visualisation du complexe covalent. Il a été choisi d'utiliser une étiquette radioactive au tritium

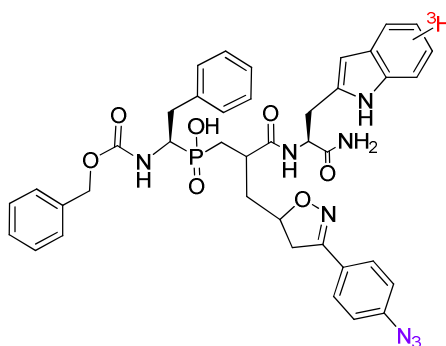


Figure 76 : structure chimique de la sonde 1

La plupart des MMP (sauf les MMP-1 et MMP-7) possèdent une cavité profonde et hydrophobe au niveau du sous-site S_1' . Une partie du sous-site S_1' possède une certaine flexibilité, notamment au niveau du bas de la boucle S_1' , tandis que le reste de la cavité est bien défini dans les différentes MMP. La taille et la séquence de la boucle S_1' sont variables selon la nature des MMP.

Nous avons décidé de positionner le groupement photoactivable en P_1' , enfoui dans la cavité S_1' . L'expérience du laboratoire dans le développement d'inhibiteurs phosphiniques de MMP montre que les longues chaînes hydrophobes en position P_1' sont bien tolérées dans la cavité S_1' . De plus, les espèces réactives formées après photo-irradiation au fond de la cavité sont plus susceptibles de réagir avec les résidus de la protéine qu'avec les molécules d'eau. Le groupement photoactivable conduit, sous irradiation, à la formation de précurseurs dont la réactivité détermine le pourcentage de modification covalente de la protéine par la sonde. L'irradiation intervenant dans un contexte structural donné, il est donc très difficile de prévoir la réactivité des groupements photoactivables au sein de la protéine. Nous avons choisi de cibler le sous-site S_1' , en plaçant le groupement photoactivable dans une position qui n'affecte pas l'affinité et assure une proximité entre l'intermédiaire formé par photo-irradiation et des groupes du sous site. Il a donc été choisi

d'utiliser dans un premier temps le groupement photoactivable de type azoture possédant un encombrement stérique faible. Il est intéressant de noter que, dans la littérature (Tableau 3), peu de groupes ont fait ce choix de placer le groupement photoactivable en position S_1' , alors que selon notre étude du contexte structural, cela s'avère comme la meilleure possibilité.

Pour la composante inhibitrice, nous avons choisi de nous intéresser à un groupement chélatant du zinc de type phosphinique. En effet, malgré un pouvoir chélatant du zinc plus faible, ce type de groupement a permis le développement d'inhibiteurs spécifiques des MMP, dont l'utilisation a été validée *in vivo*.¹⁸⁵ Ainsi, afin de pouvoir détecter l'ensemble des MMP présentes dans un milieu complexe, nous avons décidé d'utiliser une sonde dérivée d'un inhibiteur large spectre des MMP.

L'étiquette permettant la visualisation du complexe covalent enzyme-sonde est le tritium. En effet, l'utilisation de la radioactivité conduit à une sensibilité de l'ordre d'un picocurie via la détection à l'aide d'un β -imager 2000, soit une sensibilité très importante. De plus, l'utilisation de la radioactivité permet d'accéder à la quantification relative du pourcentage de modification covalente entre les différentes MMP. Contrairement à des groupements fluorescents souvent stériquement encombrants et hydrophobes, le tritium modifie très peu les propriétés physico-chimiques de la sonde, ce qui limite les interactions non spécifiques en milieu complexe.

Les travaux de David *et al.*¹⁸⁶ ont démontré que la sonde azoture **1** présente de très bonnes affinités pour les MMP (inférieures à 13 nM) mais aussi une très bonne sélectivité, dans la mesure où d'autres métalloprotéases proches des MMP ne sont pas inhibables par cette sonde **1**. De plus, il est possible de marquer spécifiquement le site actif des MMP avec cette sonde, après irradiation UV. En effet, en l'absence d'irradiation, aucun marquage de la hMMP-12 n'est observé. De plus, après pré-incubation d'un compétiteur (Figure 77) en présence d'enzymes, le marquage est fortement diminué, indiquant la nécessité d'un site actif libre pour un marquage efficace (Figure 77).

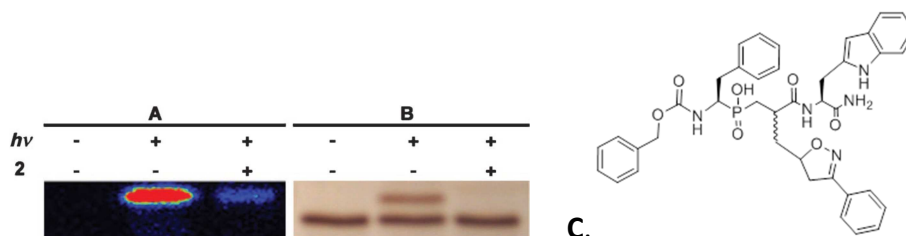


Figure 77 : modification covalente de la hMMP-12 avec la sonde azoture d'aryle. A. membrane PVDF radioactive de hMMP-12 incubée en présence ou en absence de compétiteur 2 et avant irradiation UV. B. même expérience sur gel d'électrophorèse SDS PAGE coloré au nitrate d'argent. C. structure chimique du compétiteur

La sonde ainsi développée est très sensible pour la détection de la hMMP-12 : 50 pg soit 2,5 fmol dans 25 μ L (soit 100 pM ou 2 pg / μ L) sont détectables par 2 μ M de sonde (Figure 78). Pour comparaison, les meilleures sensibilités de détection rapportées dans la littérature sont de 12 fmol pour la hMMP-9¹⁸⁰ et de 60 fmol pour la hMMP-2.¹⁷⁵

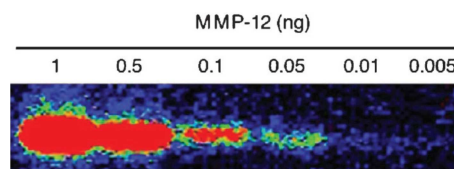


Figure 78 : sensibilité de détection de la hMMP-12 par la sonde azoture (2 μ M)

Dans cette étude les rendements de marquage ont été déterminés afin de mesurer leur impact sur la capacité de la sonde à détecter différentes MMP. Ceci a constitué le premier bilan quantitatif sur la modification covalente des MMP par une sonde ABP photoactivable dans la littérature. Malgré un très fort rendement de modification covalente pour la hMMP-12, une grande variabilité du pourcentage de modification covalente des MMP est observée (Figure 79) : la sonde modifie dans une moindre mesure les hMMP-2, hMMP-13 et hMMP-14 mais elle modifie très peu les hMMP-8, hMMP-9, hMMP-11.

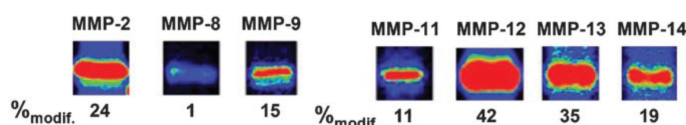


Figure 79 : pourcentages de modification covalente obtenus avec la sonde azoture développée au laboratoire¹⁸⁶

L'utilisation d'une sonde portant un groupement photoactivable de type azoture (sonde **1**) a donc permis de développer une sonde apte à modifier de façon covalente les hMMP-12 et hMMP-3, mais plus difficilement les autres MMP. Afin de mieux comprendre les variations de réactivité de l'azoture dans le contexte structural des différentes MMP, une étude approfondie du site de modification covalente des hMMP-12 et hMMP-3 a été réalisée au laboratoire.^{187,188} L'ensemble des données obtenues (analyses en spectrométrie de masse et en séquençage d'Edman, études des rendements de photomarquages des mutants de la position 241 sur la hMMP-12) permet de conclure que le groupement amine ϵ de la lysine 241 est la cible de la sonde **1** chez la hMMP-12. La dépendance du rendement de modification covalente au pH (de 45 % à 85 % de modification covalente, avec respectivement un tampon à pH 7 et à pH 12), montre que la nucléophilie de la lysine influence le pourcentage de modification covalente. Le séquençage d'Edman et la dépendance au pH du pourcentage de modification de la hMMP-3 par la sonde **1** démontrent l'implication de l'azote τ du cycle imidazole de l'histidine en position 241.

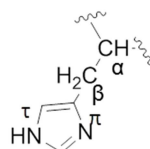


Figure 80 : structure chimique et numérotation de l'histidine 241 de la hMMP-3

Le nitrène formé par irradiation de l'azoture réagit préférentiellement avec les groupements nucléophiles dans les protéines. Seules les hMMP-3 et hMMP-12 possèdent des résidus nucléophiles présents dans cette position (respectivement une histidine et une lysine). La hMMP-9 et la MMP-12 murine (mMMP-12) possèdent une arginine en position 241. L'étude de la dépendance au pH du pourcentage de modification covalente de ces deux MMP par la sonde **1** souligne à nouveau l'importance de la nucléophilie du résidu en position 241, dans la mesure où l'atome d'azote porté par la guanidine de l'arginine a une nucléophilie plus faible que l'atome d'azote porté par la lysine ou l'histidine.

La taille et la séquence des résidus en position 241 de la boucle S₁' n'étant pas conservées entre les différents domaines catalytiques des MMP (Tableau 4), ces travaux suggèrent de changer le groupement photoactivable pour converger vers une chimie de modification des MMP plus homogène.

Tableau 4 : alignement des séquences des MMP. Le résidu en position 241 n'est pas conservé entre les différentes MMP

	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245					246	247	248	
Ni	1	6	3	9	2	9	7	11	9	11	9		6	5	2	6	10	1
MMP-1	M	Y	P	S	Y	T	F	S	G	D						V	Q	L
MMP-2	M	A	P	I	Y	T	Y	T	K	N						F	R	L
MMP-9	M	Y	P	M	Y	R	F	T	E	G	P					P	L	L
MMP-11	M	S	A	F	Y	T	F	R	Y	P						L	S	L
MMP-23	M	H	L	N	A	T	L	T	G	W						K	A	L
MMP-19	M	A	P	V	Y	E	G	Y	R	P	H					F	K	L
MMP-20	M	Y	P	T	Y	K	Y	K	N	P	Y		G			F	H	L
MMP-7	M	Y	P	T	Y	G	N	G	D	P	Q		N			F	K	L
MMP-8	M	Y	P	N	Y	A	F	R	E	T	S		N			Y	S	L
MMP-13	M	F	P	I	Y	T	Y	T	G	K	S		H			F	M	L
MMP-14	M	A	P	F	Y	Q	W	M	D	T	E		N			F	V	L
MMP-15	M	A	P	F	Y	Q	W	K	D	V	D		N			F	K	L
MMP-16	M	A	P	F	Y	Q	Y	M	E	T	D		N			F	K	L
MMP-24	M	A	P	F	Y	Q	Y	M	E	T	H		N			F	K	L
MMP-3	M	Y	P	L	Y	H	S	L	T	D	L		T	R		F	R	L
MMP-10	M	Y	P	L	Y	N	S	F	T	E	L		A	Q		F	R	L
MMP-12	M	F	P	T	Y	K	V	V	D	I	N		T	F		R	L	L
MMP-25	M	R	F	Y	Q	G	P	V	G	D	P		D	K		Y	R	L
MMP-17	M	R	P	Y	Y	S	G	P	V	G	D		P	L	R	Y	G	L

III. Objectifs de la thèse

Malgré une très grande affinité pour les MMP, la sonde azoture synthétisée au laboratoire n'a pu modifier les MMP de façon homogène entre elles. Ainsi, les rendements de modification covalente obtenus étaient importants avec la MMP-12 (42 %), mais beaucoup plus faibles pour certaines MMP (1 % pour la MMP-8). De fait, le choix du groupement photoactivable est essentiel pour moduler la capacité de modification covalente des MMP par la sonde.

Le groupement photoactivable doit être positionné pour s'insérer dans la cavité S₁'. En effet, la présence d'une cavité hydrophobe profonde chez la majorité des hMMP (sauf les hMMP-1 et hMMP-7) autorise la présence de groupements assez volumineux. De plus,

l'hydrophobicité de la cavité S_1' est un atout pour améliorer les rendements de modification covalente de l'enzyme par la sonde, dans la mesure où la sonde est très peu exposée aux molécules d'eau, donc peu susceptible de réagir avec celles-ci.

Face au manque de réactivité des nitrènes sur les liaisons C-H, nous avons décidé d'employer une sonde possédant un autre type de groupement photoactivable. Des essais préliminaires ayant démontré que l'utilisation d'un groupement benzophénone nuit fortement à l'affinité de la sonde pour certaines MMP (K_i environ 100 nM pour la hMMP-12), il a été envisagé d'utiliser un groupement de type trifluorométhylphényldiazirine. Les carbènes formés suite à l'irradiation de la diazirine peuvent s'insérer au sein de liaisons diverses (C-H, O-H, C-C), ce qui constitue un avantage important des diazirines.

L'objectif de ce travail est de réaliser la synthèse d'une nouvelle sonde ABP photoactivable possédant un groupement trifluorométhylphényldiazirine (Figure 81) pour obtenir des pourcentages de marquages homogènes et élevés vis-à-vis des MMP recombinantes et enfin, de montrer que son emploi en milieu complexe conduit à la détection de formes endogènes de MMP dans des milieux complexes.

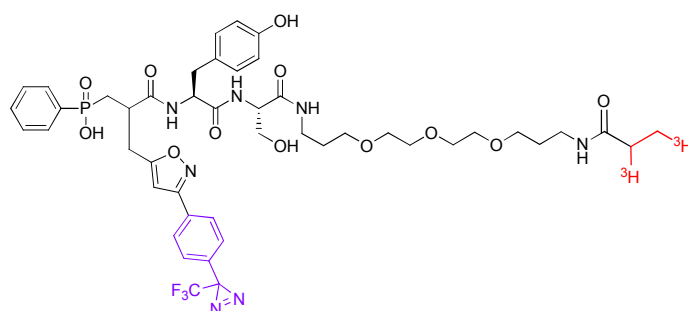


Figure 81 : structure chimique de la nouvelle sonde photoactivable pour la détection des formes actives de MMP

I. Conception et synthèse de la sonde

I. 1. Conception de la sonde

L'objectif de ce projet était de développer une nouvelle sonde présentant un profil de modification covalente des MMP supérieur à celui observé pour la sonde précédemment mise au point par le laboratoire. La conception de la sonde précédente avait été faite en prenant en compte la structure de la cavité S_1' des MMP, afin d'assurer une très bonne proximité entre le groupement photoactivable et des résidus situés dans cette cavité et donc de permettre de bons rendements de photomarquage. Ce dernier point peut être crucial, car non satisfait, il peut conduire à des sondes médiocres en termes de réactivité et donc de sensibilité de détection. Pour atteindre un très bon rendement de photomarquage, notre stratégie repose sur l'utilisation d'une chaîne latérale en position P_1' de la sonde suffisamment longue, sur laquelle est greffé en position distale un groupement photoactivable. Cette position permet au groupement photoactivable d'être enfoui dans la cavité S_1' , hors des molécules d'eau et d'être entouré de nombreux résidus du site actif des MMP. La réussite de cette stratégie requiert de ne pas compromettre l'affinité de la sonde par effet stérique, pouvant résulter d'un mauvais placement du groupement photoactivable dans la cavité S_1' . L'affinité de la sonde dicte les concentrations à utiliser pour atteindre la saturation des cibles à modifier. Il est donc avantageux que les concentrations de sonde restent faibles pour minimiser le plus possible les interactions non-spécifiques et donc la détection de nombreuses protéines hors d'intérêt et qui peuvent être très abondantes comme la sérum albumine.

Notre stratégie de conception s'est révélée judicieuse par l'obtention de rendements de photomarquage extrêmement importants pour la première sonde de photoaffinité développée au laboratoire pour cibler les MMP.¹⁸⁶ Pour satisfaire cette contrainte, historiquement, le groupement azoture avait été sélectionné car il est le moins encombrant du point de vue stérique parmi les groupements photoactivables classiquement utilisés et sa structure en position distale d'un groupement phényle apparaissait très bien adaptée au contexte de la cavité S_1' des MMP.

Sur la base de ces considérations, pour développer une deuxième génération de sonde, l'utilisation d'un groupement benzophénone comme groupement photoactivable a été écartée pour des raisons d'encombrement stérique trop important, laissant comme seul choix possible le groupement trifluorométhylphényldiazirine. Ce choix semblait porteur de possibilités nouvelles, car l'intermédiaire réactif généré par photoactivation de la diazirine

est connu pour pouvoir réagir avec un plus grand nombre d'acides aminés que le nitrène de l'azoture.¹⁶⁹ Il restait à vérifier l'impact de ce groupement sur l'affinité de la sonde pour les MMP.

En dehors de ces considérations sur l'affinité de la sonde et les rendements de photomarquage, nous avons souhaité dans ce projet augmenter la solubilité de la nouvelle sonde et aussi diminuer le photomarquage important de la sérum albumine qui avait été observé avec la sonde précédente. Pour ce faire, la partie en P₁ de la nouvelle sonde a été simplifiée, afin d'avoir moins de groupements hydrophobes à ce niveau, et le résidu tryptophane a été remplacé par une tyrosine, modification pouvant largement diminuer l'interaction de la sonde avec la sérum albumine,¹⁸⁹ puisque celle-ci porte un site d'interaction pour le tryptophane. Enfin, un petit lien PEG a été introduit à l'extrémité C-terminale, autorisant un radiomarquage pour la détection des adduits covalents.

I. 2. Synthèse de la sonde

La synthèse de la sonde a été réalisée en utilisant une synthèse sur support solide, nécessitant de préparer préalablement le synthon phosphinique A et le synthon trifluorométhylphényldiazirine B (Schéma 1). Le synthon trifluorométhylphényldiazirine B a été synthétisé par notre collègue D. Georgiadis du « Laboratory of Organic Chemistry, University of Athens », en Grèce. La synthèse du synthon A a été réalisée à partir du diéthymalonate, comme décrit dans la partie « matériel et méthodes ». Pour la synthèse de la sonde, les deux acides aminés ont été incorporés sur une résine Universal PEGNovaTag en utilisant la stratégie Fmoc, suivi par l'incorporation du synthon A. Le synthon B a été incorporé ensuite sur support solide via une activation en chloroxime puis cycloaddition 1-3 dipolaire. Après cette phase de synthèse, la molécule est libérée de son support par ajout de TFA. La sonde comporte en position P₁' un centre asymétrique, qui n'étant pas contrôlé dans notre protocole de synthèse, génère un mélange de deux diastéréoisomères pour ce composé. Ces deux diastéréoisomères ont été séparés par une étape de purification par RP-HPLC. Les deux diastéréoisomères ont été propionylés en utilisant du *N*-succinimidyl (³H)-propionate radioactif et purifiés par RP-HPLC (Figure 82). Le diastéréoisomère élué dans la première fraction HPLC (sonde **2**) présente l'affinité la plus élevée pour les MMP. Par analogie avec des travaux précédents sur ce type de composés,¹⁹⁰ le carbone α du résidu en position P₁' dans ce diastéréoisomère a été considéré comme ayant la configuration S. La sonde obtenue possède une activité spécifique de 50,7 Ci/mmol, un élément important pour la suite de ce travail, puisque la sensibilité de notre appareil pour détecter les adduits covalents radiomarqués est de 1 pCi, donc de 0,02 femtomoles théoriquement. Cependant, pour des raisons de géométrie de détection seule la moitié des désintégrations est comptée dans l'appareil. Par ailleurs si on prend un rendement de modification covalente de 50 %, ce

II. Photomarquage de MMP recombinantes

II. 1. Affinité de la sonde pour les MMP

Les affinités de la sonde **2** pour les différentes MMP ont été déterminées par tests enzymatiques en utilisant des substrats peptidiques fluorogéniques (Mca-Mat et Mca-MMP-3, voir Matériel et Méthodes), après incubation de différentes quantités de sonde en présence de chacune des MMP. Les constantes d'inhibition ont été déterminées en utilisant la méthode d'Horovitz et Levitzki et comparées à celles obtenues avec la sonde **1** (Tableau 5).¹⁹¹ Nous avons testé à la fois les MMP sous forme entière et sous forme de domaines catalytiques uniquement, afin de contrôler la capacité de la sonde **2** à interagir avec les différentes formes actives des MMP.

Tableau 5 : affinités des sonde 1 et sonde 2 pour les domaines catalytiques et les formes entières des MMP (tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 6,8, 22 °C)

hMMP	hMMP-2 cat	hMMP-3 cat	hMMP-8 cat	hMMP-9 cat	hMMP-12 cat	hMMP-13 cat	hMMP-14 cat	mMMP-12 cat
Ki sonde 1 (nM)	0,7	13	0,8	0,75	0,17	0,4	3,5	-
Ki sonde 2 (nM)	0,5	527	0,6	2,6	1,0	1,6	215	2,4

hMMP	hMMP-2	hMMP-3	hMMP-8	hMMP-9	hMMP-13	hMMP-14
Ki sonde 2 (nM)	1,5	176	3,0	5,6	2,7	140

L'évaluation des affinités de la sonde **2** pour les domaines catalytiques et les enzymes sous forme entière montre que celle-ci se comporte comme un inhibiteur puissant de ces différentes formes de MMP (hMMP-2, -8, -9, -12 et -13), avec des affinités cependant plus modestes pour les hMMP-3 et hMMP-14 (Tableau 5). A l'exception de ces deux MMP, le profil d'affinité de la sonde **2** est similaire à celui observé pour la sonde **1** (Tableau 5). Les différences d'affinité observées pour les MMP-3 et MMP-14 peuvent provenir de l'encombrement stérique plus important du groupement trifluorométhylphényldiazirine par rapport au groupement azoture, ou bien des modifications introduites dans les positions P₂' et P₃' de la sonde **2**.

Compte tenu de l'affinité nanomolaire de la sonde **2** pour les différentes MMP (sauf les MMP-3 et MMP-14), une concentration de 100 nM dans les expériences en milieux complexes a été choisie, car elle permet d'atteindre la saturation des formes actives de MMP, avant photoactivation, excepté pour les MMP-3 et MMP-14 qui ne seront que partiellement inhibées par la sonde.

II. 2. Modification covalente des MMP recombinantes

L'étude des complexes covalents enzyme-sonde comprend les étapes suivantes : une incubation à l'abri de la lumière de la sonde en présence de MMP afin de permettre la formation du complexe et de vérifier que l'inhibition des MMP est totale pour les concentrations de sonde choisie ; puis l'étape d'activation par photoirradiation à une température de 10 °C. La présence d'un complexe covalent est ensuite analysée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes, afin de séparer les adduits covalents de l'excès de sonde. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride), qui est analysée sur un radioimageur pour détecter les adduits covalents portant le tag radioactif. Alternativement, la modification covalente des domaines catalytiques des MMP par la sonde peut être aussi observée sur gel d'électrophorèse révélé au nitrate d'argent. En effet, pour les domaines catalytiques des MMP, une séparation entre l'enzyme modifiée par la sonde (bande supérieure) et la forme non modifiée de l'enzyme (bande inférieure) sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE a été documentée précédemment.¹⁸⁶

II. 2. a) Marquage covalent du site actif des MMP

Afin d'établir que l'observation de l'adduit met en jeu obligatoirement la formation d'un lien covalent et ne résulte pas d'un complexe MMP/sonde non-covalent, nous avons comparé les résultats obtenus avec ou sans irradiation de la sonde en utilisant le domaine catalytique de la hMMP-9. En absence d'irradiation, aucun signal de radioactivité n'est détecté sur les membranes, par contre un signal apparaît après photoactivation. Ces résultats indiquent que la détection d'un signal de radioactivité résulte bien d'une modification covalente de la MMP-9 par la sonde (Figure 83).

S'agissant de réaliser la détection de formes actives de MMP, il est impératif de montrer que le photomarquage implique le site actif de l'enzyme. Une expérience de compétition en présence de LD500.1, inhibiteur puissant des MMP ($K_i = 0,004$ nM pour la hMMP-9), a donc été réalisée. Aucun signal n'est détecté en radioactivité car l'inhibiteur LD500.1 est en complexe avec la MMP, ce qui bloque l'accès au site actif pour la sonde. Ces résultats montrent qu'il est donc nécessaire d'avoir un site actif libre pour avoir un marquage de MMP avec la sonde **2**.

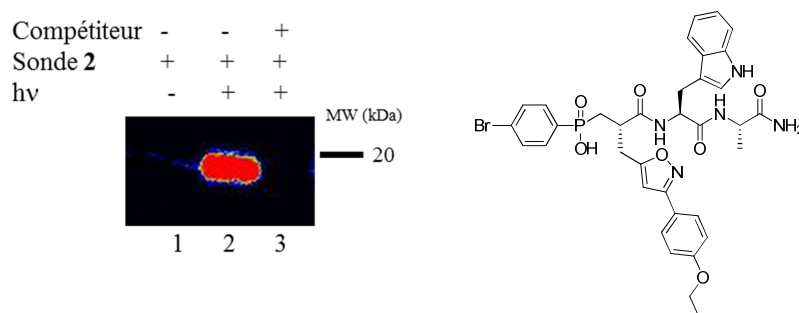


Figure 83 : marquage covalent de la MMP-9 et structure de l'inhibiteur LD500.1. La hMMP-9 (250 nM) a été incubée en présence de sonde (1 μ M), sans photoirradiation (piste 1) ou avec photoirradiation (piste 2). La piste 3 montre le résultat d'une expérience de compétition en présence de LD500.1 (10 μ M)

Les expériences réalisées sur la hMMP-9 indiquent donc très clairement que le photomarquage a lieu au niveau du site actif de l'enzyme, un résultat en accord avec une conception de la sonde reposant sur l'utilisation d'un motif phosphinique, inhibiteur puissant des MMP. Cette sonde doit donc permettre la détection uniquement de formes actives de MMP.

II. 2. b) Modification d'un panel de MMP recombinantes

La capacité de la sonde **2** à modifier un panel plus large de MMP (MMP-2, -3, -8, -9, -12, -13, -14, chacune séparément à une concentration finale de 250 nM) est reportée dans la Figure 84, où sont présentées des expériences de modification analysées par gel SDS-PAGE révélé au nitrate d'argent. La présence d'un dédoublement de bande pour tous les domaines catalytiques des MMP testées, après traitement par la sonde **2**, montre que celle-ci est capable de modifier l'ensemble des MMP. Cependant, des différences dans le rendement de photomarquage entre les différentes MMP sont suggérées par la variation d'intensité entre bandes inférieures et supérieures, qui reflète le rendement de marquage.

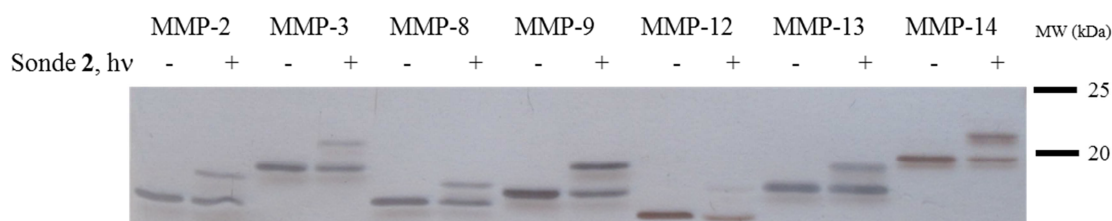


Figure 84 : gel d'électrophorèse SDS-PAGE des domaines catalytiques des MMP (250 nM) modifiés par la sonde **2** (1 μ M). (dépôt de 2 pmol de MMP sur le gel SDS-PAGE révélé au nitrate d'argent)

Pour accéder à une meilleure quantification des pourcentages de photomarquage, nous avons utilisé les données issues de la radioimagerie, puisque l'acquisition au β -imageur permet d'accéder à un comptage absolu du signal de radioactivité, à l'inverse du marquage

au nitrate d'argent. Néanmoins, le signal observé sur le gel SDS-PAGE révélé au nitrate d'argent peut être exploité en faisant le rapport des intensités des bandes inférieures/supérieures pour une même MMP. Sur la base de plusieurs expériences, nous avons déduit un rendement de modification de 50 % à la MMP-9 (Figure 84), puis attribué ce pourcentage au signal de radioactivité observé pour la MMP-9. Le rapport des signaux de radioactivité permet alors de calculer les rendements de modification covalente pour toutes les autres MMP, reportés dans la Figure 85. Cette approche pour le calcul de rendement, en prenant le signal à l'argent de la MMP-9 en référence, a été choisie. Bien qu'il soit possible de calculer les quantités de MMP à partir du signal de radioactivité, cela suppose qu'il existe un rendement de transfert de 100 % des protéines du gel SDS-PAGE vers la membrane PVDF sur laquelle est fait le comptage. Or on sait que ce rendement n'atteint pas forcément 100 %.

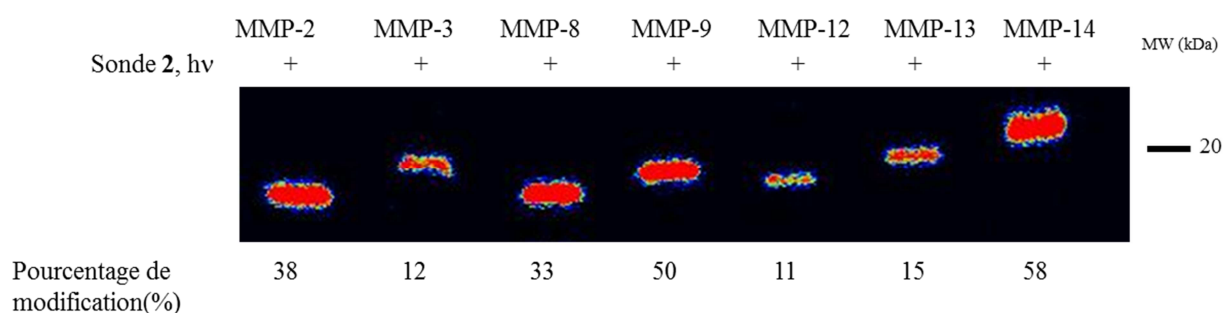


Figure 85 : membrane PVDF analysée en radioactivité des domaines catalytiques des MMP (250 nM) modifiés par la sonde 2 (1 μ M). 100 fmol ont été déposées sur gel SDS-PAGE à 15 % d'acrylamide. Les pourcentages de modification covalente ont été évalués à partir du comptage en radioactivité, sur une base de 50 % de modification de la hMMP-9

D'après ces données, les MMP-3 et MMP-12 apparaissent les moins bien modifiées par la sonde 2 (respectivement 12 % et 11 %), alors que les MMP-9 et MMP-14 sont modifiées avec des rendements particulièrement importants, respectivement 50 % et 58 % (Figure 85).

De façon intéressante, la sonde 2, qui a une affinité modeste pour la MMP-14, montre un des plus forts pourcentages de modification, indiquant que l'affinité de la sonde pour sa cible n'est pas nécessairement un élément déterminant pour le rendement de photomarquage. Compte tenu de l'affinité de la sonde pour la MMP-14 (215 nM) et des conditions d'utilisation de la sonde (1 μ M) dans nos expériences, toute la MMP-14 n'était pas saturée. Cette situation conduit donc à sous-estimer le pourcentage de marquage de cette MMP par la sonde 2.

Les pourcentages obtenus précédemment pour la modification covalente des MMP avec la sonde azoture sont présentés dans le Tableau 6, pour comparaison avec l'efficacité de la nouvelle sonde (sonde 2).

Tableau 6 : pourcentages de modification covalente des MMP par la sonde 1 et la sonde 2

hMMP	hMMP-2 cat	hMMP-3 cat	hMMP-8 cat	hMMP-9 cat	hMMP-12 cat	hMMP-13 cat	hMMP-14 cat
% de modification covalente par la sonde 1	24	65	1	15	42	35	19
% de modification covalente par la sonde 2	38	12	33	50	11	15	58

Les pourcentages de modification covalente des différentes MMP par la sonde diazirine (sonde **2**) se révèlent plus élevés que ceux obtenus avec la sonde azoture (sonde **1**), à l'exception des MMP-3, MMP-12 et MMP-13. Ces expériences peuvent s'expliquer par la différence de réactivité des carbènes (pour la sonde diazirine) et des nitrènes (pour la sonde azoture) et leur capacité à former un lien covalent selon la nature des résidus situés à proximité du groupement réactif. Dans le contexte précis d'une réaction de photochimie au sein d'une cavité protéique, le carbène semble avoir une réactivité globalement plus universelle avec les différentes MMP, par rapport au nitrène. La modification très élevée des MMP-3 et MMP-12 par la sonde azoture a été expliquée par la présence dans ces enzymes de deux résidus Histidine et Lysine, respectivement, portant des fonctions nucléophiles sur leur chaîne latérale modifiées par le dérivé nitrène.¹⁸⁷ Il est intéressant de noter qu'avec un carbène, cette nucléophilie aurait une contribution plus faible dans l'efficacité de modification covalente ou que la chimie de modification covalente ne serait pas la même.

Les expériences précédentes de photomarquage ont été réalisées sur les domaines catalytiques des MMP. Afin de montrer que la sonde peut aussi modifier de façon covalente les formes entières des MMP, une comparaison entre les pourcentages de modification de la hMMP-9 forme entière et son domaine catalytique seul a été réalisée (Figure 86).

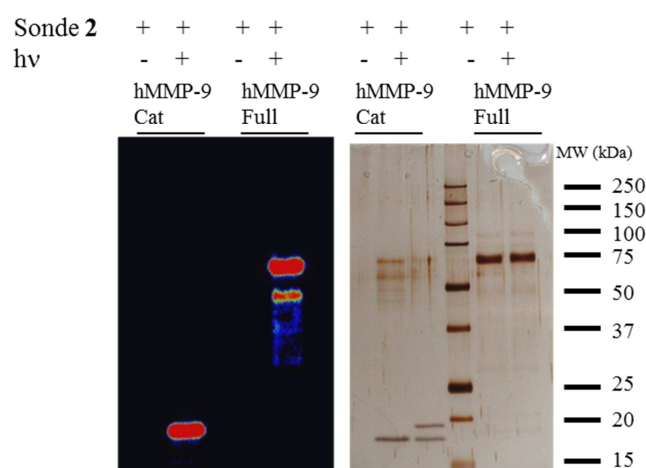


Figure 86 : membrane PVDF analysée en radioactivité et gel SDS-PAGE révélé au nitrate d'argent de la modification de la forme entière de la MMP-9h et du domaine catalytique de la MMP-9h (250 nM) par la sonde (1 μ M), (200 fmol déposées sur la membrane PVDF et 2 pmol déposées sur le gel coloré au nitrate d'argent)

La sonde modifie de façon identique la forme entière et le domaine catalytique de la MMP-9h (respectivement 46 % et 50 % de pourcentage de modification covalente). On peut dans cette expérience, réaliser la sensibilité offerte par la radioimagerie. En effet, celle-ci indique qu'un produit d'autolyse de la MMP-9 est modifié par la sonde, dont la quantité peut être calculée en faisant les rapports d'intensité entre forme entière et sous-produit (12 %, 24 fmol sur la membrane PVDF). De façon intéressante, l'existence de ce sous-produit est très difficile à détecter dans le gel coloré à l'argent.

II. 3. Sensibilité de détection des MMP

Afin de connaître la limite de détection pour la modification covalente de la hMMP-9 par la sonde, différentes quantités de hMMP-9 (0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM et 2 nM) ont été incubées en présence de sonde (100 nM). Ces expériences permettent de déduire une limite de 0,5 femtomoles pour la détection de la MMP-9 (50 pM dans 10 μ L, 10 pg de protéine, Figure 87). Ci-dessus nous avons calculé une limite de détection théorique de 0,08 femtomoles, ce qui laisse penser que le rendement de transfert des protéines n'est pas total. Il se peut aussi que la faible quantité de protéines manipulée dans ces expériences entraîne des pertes de matériel lors des manipulations.

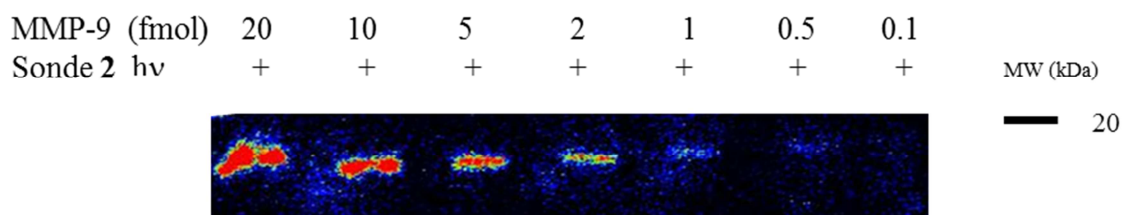


Figure 87 : membrane PVDF analysée en radioactivité présentant différentes quantités de hMMP-9 modifiée par la sonde (100 nM)

De façon similaire, la sensibilité de détection de la hMMP-12 est de 2 femtomoles (200 pM dans 10 μ L, 40 pg de protéines, Figure 88).

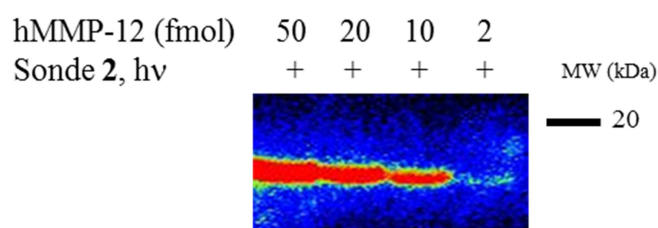


Figure 88 : membrane PVDF analysée en radioactivité présentant différentes quantités de hMMP-12 modifiée par la sonde (100 nM)

La sonde azoture (sonde 1) possède une limite de détection de 2,5 femtomoles (100 pM dans 25 μ L, 50 pg de protéine) pour la hMMP-12. Cette limite de détection est comparable à celle obtenue avec la sonde 2. La sonde 2 ayant un rendement de modification covalente pour la hMMP-12 quatre fois plus faible que celui de la sonde 1 (11 % et 45 % pour la sonde 2 et la sonde 1, respectivement), elle devrait donc avoir une moins bonne sensibilité. Cependant, la radioactivité spécifique de la sonde 2 est six fois plus élevée (50,7 Ci/mmol et 8 Ci/mmol pour la sonde 2 et la sonde 1, respectivement), ce qui contrebalance les différences sur les rendements de modification covalente et explique la sensibilité obtenue.

A pourcentages de modification covalente comparables, la sonde diazine a une meilleure sensibilité pour la détection de la hMMP-9, par rapport à la sensibilité de la sonde 1 pour la hMMP-12. Ce gain de sensibilité d'un facteur 5 est aussi à mettre en relation avec la radioactivité spécifique plus importante de la sonde diazine par rapport à la sonde azoture.

Cette sensibilité sera sans doute un atout pour permettre la détection de formes actives de MMP dans des milieux complexes.

II. 4. Marquage d'un mélange de domaines catalytiques de MMP en tampon et en milieu complexe

La sonde doit être capable dans son utilisation finale de modifier simultanément plusieurs MMP. Pour vérifier ce point, des expériences de modification de MMP par la sonde ont été réalisées en tampon, mais aussi dans un milieu complexe de protéines, avec un mélange de quatre MMP : hMMP-2, hMMP-9, hMMP-12 et hMMP-13, (chaque MMP étant à une concentration finale de 2,5 nM) modifiées par la sonde 2 (100 nM). L'utilisation des gels d'électrophorèse bidimensionnels pour séparer les quatre domaines catalytiques permet d'observer quatre spots de radioactivité, correspondant chacun à une MMP (Figure 89a). Les

quatre mêmes MMP ont été ajoutées à un milieu complexe composé du cytosol de cellules U 937 (40 µg), mais à une concentration de 0,25 nM pour chacune d'entre elles (Figure 89b).

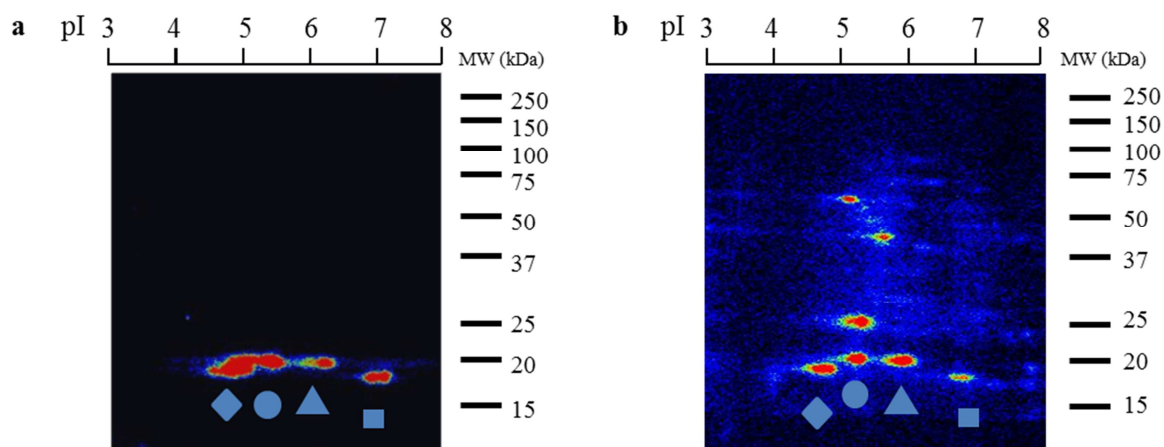


Figure 89 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant le marquage covalent d'un mélange de MMP (MMP-2 ◆, MMP-9 ●, MMP-12 ■ et MMP-13 ▲) avec la sonde. a) un mélange de quatre MMP chacune à 2,5 nM a été marqué en présence de sonde (100 nM) dans un tampon 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,01% Brij-35, pH 6.8, (50 fmol de chacune déposées sur gel SDS-PAGE) b) un mélange de quatre MMP chacune à 0,25 nM a été marqué en présence de sonde (100 nM) dans 40 µg d'un extrait cytosolique de cellules U937. (5 fmol de chaque MMP déposées sur gel SDS-PAGE)

Malgré l'utilisation de MMP à des concentrations dix fois plus faibles, le marquage des quatre MMP est toujours possible, même dans un milieu protéique complexe. La sonde est ainsi capable de détecter la présence de 5 femtomoles (100 pg) de chaque MMP présente dans un protéome complexe de 40 µg de protéines totales, donc dans ces conditions, les MMP ne représentent que 0,00025 % des protéines totales. Ce résultat indique la très grande spécificité d'interaction de la sonde **2**, malgré la présence de diverses protéines dans ce milieu, dont certaines présentes en très grande quantité. La présence d'autres protéines marquées (trois spots radioactifs aux pI de 5 et 5,5) peut être due, soit à des protéines non spécifiques marquées par la sonde, soit à des MMP effectivement présentes dans ces milieux, car les MMP possèdent ce type de point isolélectrique et de gamme de poids moléculaire et les macrophages sont connus pour exprimer quasiment toutes les MMP. Les MMP étant des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire, on peut poser l'hypothèse que ce marquage observé dans le cytosol puisse refléter la contamination par le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire ou bien représenter le marquage des MMP dans les voies de sécrétion. La preuve de concept montrant que le marquage d'un mélange de MMP en milieu complexe étant validée, les autres protéines marquées n'ont pas fait l'objet d'études complémentaires, car elles correspondent à des protéines très faiblement exprimées et donc seront très difficiles à caractériser par

spectrométrie de masse. En effet, sur la base de l'intensité des signaux observés, on peut estimer que les quantités marquées sont de l'ordre de 0,5 à 5 femtomoles.

II. 5. Etude des mutants de la hMMP-12

L'explication des différences de pourcentage de rendement de modification peut reposer sur la nature du(des) résidu(s) modifié(s) dans chaque MMP. On sait en effet, d'après les travaux du laboratoire, que la position du groupement photoactivable dans la cavité S_1' se trouve proche d'une zone présentant des différences de résidus entre les différentes MMP. Nous avons donc cherché à identifier le site de la modification chimique réalisée par la sonde **2** dans la MMP-12 et la MMP-9, en utilisant les approches qui s'étaient révélées fructueuses dans le cas de la première sonde azoture, reposant sur l'analyse de fragments tryptiques des adduits covalents par micro-HPLC couplée à la spectrométrie de masse. En dépit de nombreux efforts, il n'a pas été possible d'identifier le résidu modifié par la sonde **2** pour ces deux MMP.

L'analyse des sites de modification de la sonde **1** a révélé que la hMMP-12 était modifiée au niveau de l'amine ϵ de la lysine 241, située dans la boucle S_1' .¹⁸⁷ L'étude de mutants de la position 241 par la sonde **1** a par ailleurs confirmé cette identification, en montrant que la substitution de la lysine par différents résidus entraînait une forte diminution des rendements de photomarquage, qui tombent à 5 % et moins dans ces mutants (Figure 90). Les mutants de la position 241 dont les chaînes latérales sont occupées par des atomes de nucléophilie faible (Arg, Gln, Thr) sont modifiés avec des rendements plus faibles que la MMP-12 « wild-type ». A cet égard, le rendement de modification covalente avec l'histidine est plus faible qu'attendu, montrant que le paramètre de la nucléophilie seul ne suffit pas à expliquer les pourcentages de modification covalente, mais qu'il faut aussi tenir compte des propriétés conformationnelles du résidu en position 241.

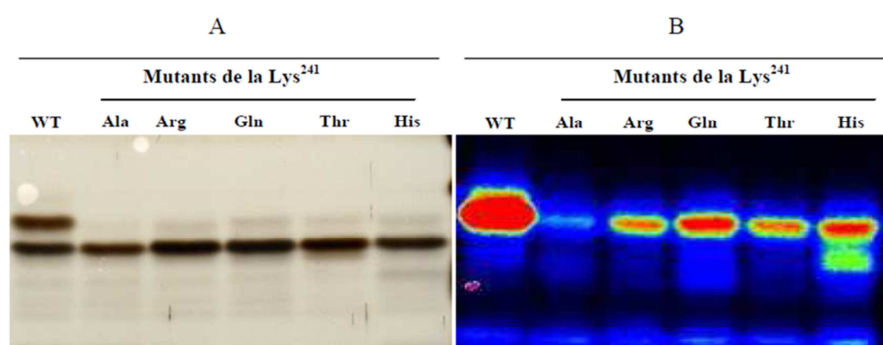


Figure 90 : Gels SDS-PAGE mono dimensionnels des complexes hMMP-12 (1µM)/sonde 1 (2µM) et mutants (1µM)/sonde 1 (2µM) après irradiation, suivis (A) d'une coloration au nitrate d'argent et (B) d'une mesure de la radioactivité après transfert sur membrane de PVDF. Dans chaque puits, 5 pmol de protéines totales actives ont été déposées (d'après thèse AS Dabert-Gay)

Tableau 7 : tableau des pourcentages de modification covalente (d'après thèse AS Dabert-Gay)

hMMP-12	K241H	K241A	K241R	K241T	K241Q	WT
% de modification covalente par la sonde 1	6	2	4	4	5	42

La prise en compte du contexte structural reporté sur la Figure 91 montre quels sont les résidus situés en proximité de l'azoture dans la sonde **1** (pour rappel la lysine est extrêmement flexible en solution, donc le groupe ϵ amino de la chaîne latérale peut se rapprocher du groupement azoture et expliquer la modification observée pour la sonde **1**). Dans le cas de la diazirine, on voit que ce groupe est aussi très proche de la position 241, mais compte tenu des différences de réactivité, la chimie de modification pourrait être très différente entre azoture et diazirine.

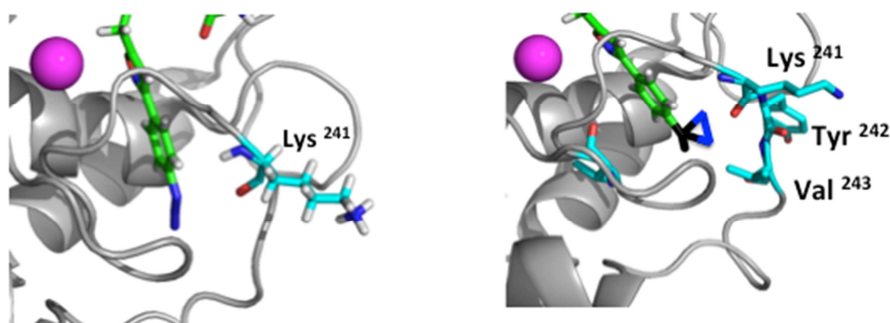


Figure 91 : contexte structural de la hMMP-12 en présence de la sonde 1 (à gauche) ou de la sonde 2 (à droite)

En l'absence de données directes sur les sites de modification de la sonde **2**, nos remarques ci-dessus nous ont incités à évaluer les rendements de marquage dans les différents mutants de la position 241 de la MMP-12, des données susceptibles de nous fournir des indications indirectes sur le site de modification de cette nouvelle sonde.

L'affinité de la sonde **2** pour ces mutants a tout d'abord été contrôlée. Comme le révèlent les données reportées dans le Tableau 8, l'affinité observée pour la hMMP-12 est conservée dans les mutants.

Tableau 8 : Ki de la sonde vis-à-vis des mutants de la MMP-12

MMP-12	K241H	K241A	K241R	K241T	K241Q	WT
Ki sonde 2 (nM)	0,6	0,8	0,7	0,95	0,9	1,0

La modification covalente des mutants K241H, K241A, K241R, K241T et K241Q par la sonde **2** a été étudiée dans des conditions expérimentales similaires à celles de la modification covalente des domaines catalytiques des MMP (Figure 92).

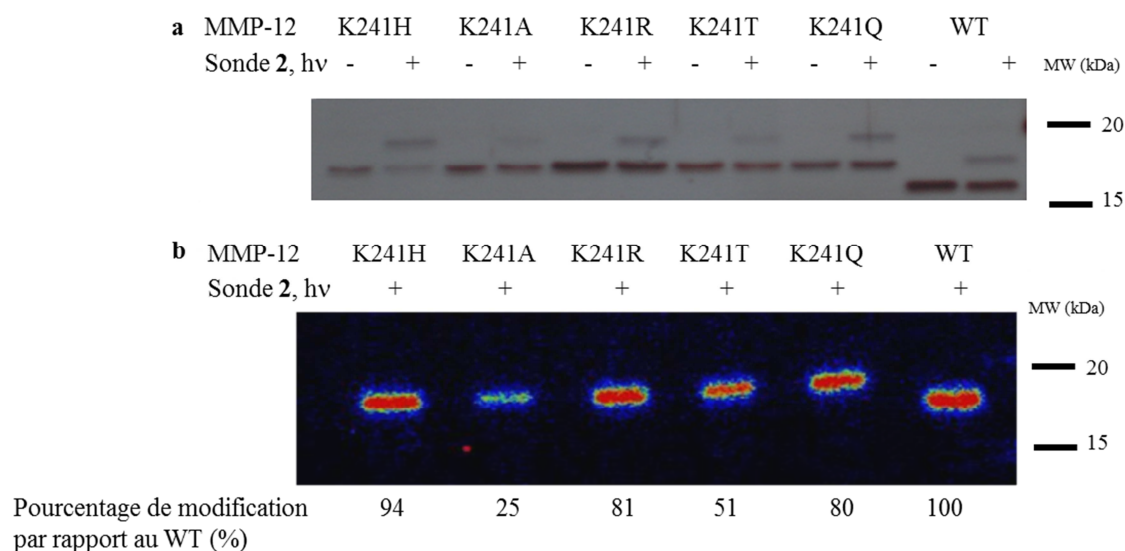


Figure 92 : modification covalente des mutants de la MMP-12h (250 nM) par la sonde (1 μ M). a) gel d'électrophorèse révélé au nitrate d'argent (2 pmol déposées) b) membrane PVDF révélée en radioactivité (200 fmol déposées)

La variabilité des pourcentages de modification covalente de ces mutants par la sonde **2** suggère que la mutation du résidu en position 241 a une influence sur la modification covalente. On note que les pourcentages observés pour la sonde **2** restent très supérieurs à ceux observés pour la sonde **1**. Le pourcentage de modification covalente varie peu lorsque la position 241 est occupée par Histidine, Arginine ou Glutamine. L'impact plus important de la mutation de la Lysine en Thréonine ou Alanine peut provenir de différences conformationnelles imposées par la nature de la chaîne latérale, plus de flexibilité dans le cas de l'alanine et plus grande contrainte en présence de la thréonine. La sensibilité des rendements de marquage à la nature du résidu en position 241, conjugué au maintien de très bons rendements de marquage, suggère que la sonde **2** pourrait cibler plutôt le squelette peptidique de la lysine 241 que la chaîne latérale de l'acide aminé dans cette position.

II. 6. Conclusion sur le marquage des MMP recombinantes

La sonde développée dans ce projet, portant un groupement trifluorophénylméthyl diazirine en position P_1' ciblant des résidus de la cavité S_1' des MMP, est capable de détecter les formes actives des MMP, un résultat indiquant qu'elle pourra être utilisée comme une sonde ABP. Elle a de surcroît une très bonne affinité pour plusieurs

MMP, mais plus modeste pour les MMP-3 et MMP-14. L'utilisation du groupement diazirine à la place du groupement azoture aboutit à une sonde capable de modifier un panel de sept MMP en tampon, avec des rendements de modification covalente globalement bien plus élevés que ceux reportés pour la sonde **1**, notamment pour la MMP-8 avec un pourcentage passant de quelques pourcents pour la première sonde à 33 % pour la nouvelle. Les très bons rendements de photomarquage que nous obtenons sont liés à la conception de nos sondes, et notamment à l'emplacement stratégique du groupement photoactivable venant s'enfouir dans le bas de la cavité S_1' , en proximité de nombreux résidus des MMP et probablement très peu exposé aux molécules d'eau. Bien que des sondes ABP aient été développées avec des groupements photoactivables en position P_1' , dans tous ces cas l'emplacement du groupement photoactivable est situé plutôt en partie haute de la cavité S_1' , dans une partie extrêmement rigide pouvant limiter l'efficacité de modification covalente. A l'inverse, la sonde place le groupement photoactivable dans une région plus « flexible » de la cavité S_1' , ce qui pourrait potentiellement constituer un handicap, mais qui est compensé par la présence de nombreux résidus modifiables.

L'intérêt d'un bon rendement de marquage est illustré dans le cas de la MMP-14, pour laquelle la plus faible affinité de la sonde est compensée par un très fort rendement de modification. L'utilisation de cette sonde à des concentrations de 100 nM dans une application en milieu complexe permet le radiomarquage d'un mélange de quatre MMP, présentes dans des quantités extrêmement faibles (5 femtomoles de chaque MMP placées dans un mélange complexe contenant 40 μ g de protéines, soit 0,00025 % de protéines d'intérêt). Comparée à la sonde développée par le groupe de Cravatt,¹⁷⁵ on note un niveau de bruit de fond bien plus faible dans le cas de la sonde **2** (Figure 59), élément contribuant à diminuer fortement le seuil de détection par un bon rapport signal/bruit. Pour rappel, le seuil de détection reporté par Cravatt pour la MMP-2 en mélange complexe était de 60 femtomoles comparé à 0,5 femtomoles pour la sonde **2** vis-à-vis de MMP-9. Enfin le nombre très réduit de protéines marquées en mélange complexe indique la très bonne spécificité de cette sonde, une qualité essentielle pour pouvoir détecter des quantités probablement très faibles de MMP dans des mélanges complexes, comprenant des protéines en très forte abondance. A cet égard, il est intéressant de rappeler que la sonde développée par Cravatt pour marquer des MMP n'a pas pu permettre la détection de formes endogènes de MMP, mais a en revanche conduit à modifier plusieurs autres protéases à zinc.

Nos efforts sur l'identification du site de modification covalente par la sonde **2** des MMP-12 et MMP-9 par spectrométrie de masse n'ont pas abouti. Il a cependant été observé

que la mutation des résidus présents en position 241 avait un effet sur les pourcentages de modification covalente de la MMP-12, et donc que cette position pourrait être la cible de la sonde **2** pour cette MMP, mais avec une modification ciblant plutôt le squelette que la chaîne latérale comme démontré pour la sonde précédente. La sonde **2** possédant toutes les qualités requises de spécificité et de sensibilité, ceci nous a conduit à éprouver sa capacité à détecter des MMP dans des contextes pathologiques.

III. Etude de milieux complexes avec la sonde

Malgré le développement de nombreuses sondes ABP dirigées contre les MMP, il n'existe aujourd'hui aucune publication reportant la détection de formes endogènes de MMP à partir de fluides biologiques ou d'extrait de tissus. Les seules détections de formes endogènes de MMP concernent des travaux réalisés à partir de culture cellulaire. Pour éprouver l'efficacité de notre sonde, nous avons opté dans un premier temps pour un fluide biologique permettant un accès le plus rapide possible aux MMP endogènes, ceci afin de limiter la perte de ces formes pouvant être instables, si le temps et le nombre de manipulations sont trop importants. Nous avons donc choisi pour cette étude de prendre des lavages bronchoalvéolaires (BAL) provenant de souris exposées à des nanoparticules de carbone induisant une réponse inflammatoire aigüe et rapide dans leurs poumons. Ce système permet un accès direct à un fluide biologique dans le laboratoire, recueilli le matin et traité le plus rapidement possible par ajout de la sonde, afin de bloquer le site actif des formes actives de MMP par la sonde, cette inhibition pouvant empêcher des réactions d'autolyse/protéolyse des MMP dans ces milieux. Du point de vue expérimental, la difficulté de ce modèle réside dans le protocole d'exposition que nous avons choisi pour administrer les particules. En effet, au lieu d'utiliser un protocole d'instillation intratrachéale, nous avons opté pour un protocole dit « d'aspiration pharyngique », permettant un meilleur contrôle de la quantité de solution de particules entrant dans le poumon des animaux, aboutissant à une meilleure reproductibilité des expériences entre animaux. Le choix de ce modèle animal se justifiait par ailleurs, car il est considéré comme un « modèle » de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Pour cette maladie respiratoire très invalidante chez l'homme, sur la base d'une étude portant sur une association du polymorphisme du promoteur du gène de la MMP-12, il a été proposé que la MMP-12 jouerait un rôle déterminant sur la fonction respiratoire de patients BPCO.⁵⁰ Suite à ce travail publié dans « New England Journal of Medicine », différents groupes dans le monde ont commencé à développer des approches visant à détecter la MMP-12 en utilisant des anticorps. Par ailleurs, dans ce modèle murin d'exposition à des nanoparticules, dans les lavages

bronchoalvéolaires, il a été reporté par immunohistologie, 3 jours après l'administration des particules, une mobilisation très rapide de différentes cellules dont des macrophages exprimant de la MMP-12, ainsi qu'une activité élastolytique attribuée à la production de MMP-12 sous forme active.¹⁹² Cependant, on doit noter que l'attribution de l'activité élastolytique n'est pas directe dans cette étude, mais repose seulement sur la détection de MMP-12 par des anticorps, sans aucune preuve que la MMP-12 détectée corresponde à une forme active et soit responsable de l'activité élastolytique observée. Nous avons donc repris ce modèle, avec pour objectif principal de pouvoir détecter la MMP-12. Comme déjà mentionné, les macrophages activés étant connus pour exprimer d'autres MMP, la sonde **2** pourrait permettre la détection d'autres MMP, dont la MMP-9, très bien marquée par celle-ci.

III. 1. Caractérisation de la sonde 2 vis-à-vis de la mMMP-12

Pour commencer cette étude, nous avons tout d'abord déterminé l'affinité de la sonde **2** vis-à-vis de la forme murine de MMP-12 (mMMP-12), ainsi que les rendements de modification car la position 241 de cette forme murine possède un résidu arginine à la place de la lysine. Cette différence avait été à l'origine de notre incapacité à détecter des formes murines de MMP-12 avec la première sonde. L'affinité de la sonde pour la mMMP-12 est de 2,4 nM, donc du même ordre de grandeur que pour la hMMP-12. Par ailleurs, comme le révèle la Figure 93a, la sonde **2** permet une détection de la forme murine de la MMP-12, autorisant un seuil de détection de 1 femtomole, avec un rendement de marquage de 23 %. Enfin les expériences de compétition, en utilisant un inhibiteur sélectif de la MMP-12 interagissant avec le site actif de l'enzyme, ont confirmé que la sonde agissait au niveau du site actif de cette MMP (Figure 93b), comme attendu, confirmant son statut de sonde ABP.

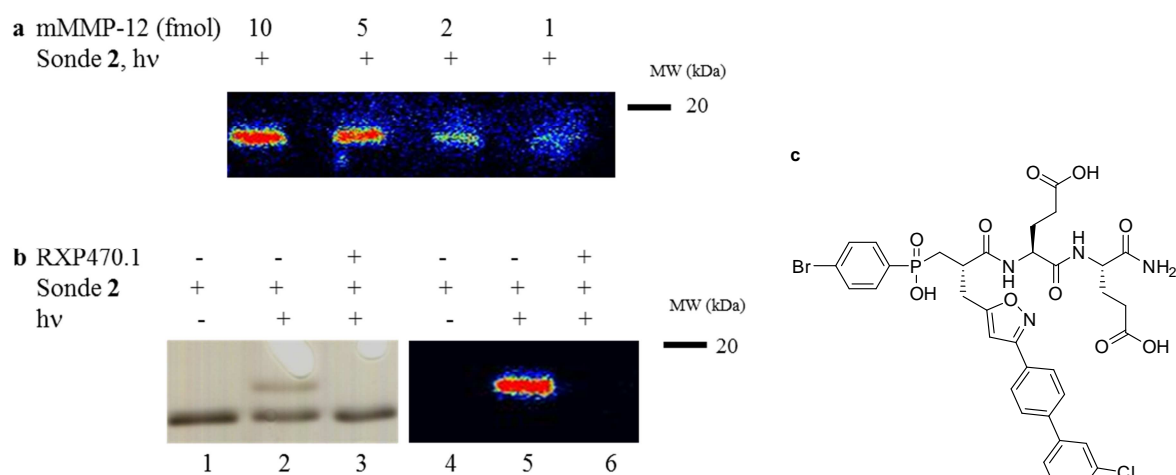


Figure 93 : caractérisations de la mMMP-12. a) sensibilité de détection par la sonde 2 b) marquage covalent du site actif de la mMMP-12 analysé. La mMMP-12 (250 nM) a été incubée en présence de sonde (1 μ M), sans photoirradiation (pistes 1, 4) ou avec photoirradiation (pistes 2, 5). Une expérience de compétition en présence de RXP470.1 (10 μ M) a été réalisée (piste 3, 6). c) structure de l'inhibiteur RXP470.1

III. 2. Marquage de formes endogènes de la mMMP-12 dans les BAL

Le traitement par la sonde **2** de BAL obtenus à partir de souris non traitées par les particules n'engendre que le marquage d'une protéine située vers 72 kDa. Cette bande intense peut être attribuée au marquage de la sérum albumine, protéine présente dans les BAL, bien que son poids moléculaire apparent soit plutôt attendu vers 66 kDa. L'addition de sérum albumine dans un tampon entraîne effectivement un marquage très intense vers 68 kDa. En revanche, lorsque des BAL d'animaux exposés aux particules sont traités avec la sonde **2**, deux bandes supplémentaires apparaissent par rapport aux contrôles, une au-dessus de 72 kDa et l'autre vers 25 kDa (Figure 94). Donc, l'exposition des animaux aux nanoparticules induit la présence de deux protéines dans le BAL, modifiables de façon covalente par la sonde **2**.

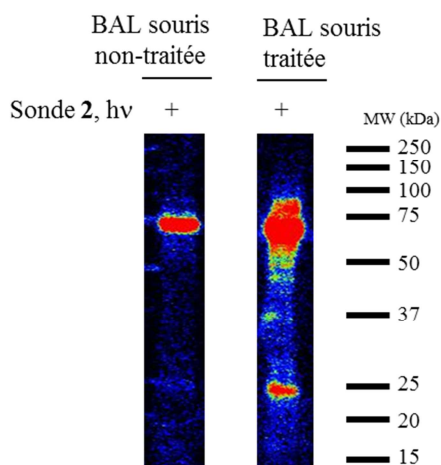


Figure 94 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant le marquage des BAL d'une souris non-traitée (à gauche, 1,4 μ g de protéines totales) et d'une souris traitée par les nanoparticules (à droite, 2,4 μ g de protéines totales) par la sonde 2 (100 nM)

Le traitement des culots de cellules isolées des BAL des animaux traités par la sonde 2 ne montrent quasiment aucun marquage, seules restent une protéine très faiblement marquée à 72 kDa, attribuée à une contamination par le sérum albumine et une protéine à 16 kDa (Figure 95). L'expérience de compétition avec le RXP470.1, inhibiteur sélectif de la hMMP-12, ne montre pas de variation d'intensité du marquage de la protéine à 16 kDa, ce qui nous a conduit à considérer ce marquage comme non-spécifique. L'analyse des culots cellulaires a été réalisée, car plusieurs études suggèrent la présence de MMP-12 sous forme active à la surface des macrophages, théoriquement il était donc possible de retrouver cette protéine dans les fractions cellulaires. L'absence de détection MMP-12 au poids moléculaire attendu (25 kDa) dans les fractions cellulaires nous a conduits à nous intéresser dans la suite de cette étude qu'aux résultats obtenus à partir des BAL.

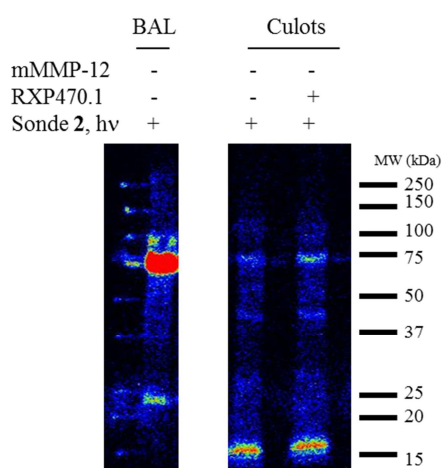


Figure 95 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant le marquage des BAL (2,7 μ g de protéines totales) et du culot cellulaire correspondant par la sonde (100 nM) en présence ou en absence de RXP470.1 (10 μ M)

L'observation d'une bande à 25 kDa dans les BAL est cohérente avec un marquage de la MMP-12. En effet, après activation par élimination de son propeptide, cette MMP est connue pour générer une première forme à 45 kDa qui se dégrade très rapidement pour produire un domaine catalytique pouvant avoir ce poids moléculaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc réalisé des expériences de compétition avec le RXP470.1, un inhibiteur sélectif de la MMP-12. Avant de faire ces expériences, nous avons pris soin de déterminer la capacité du RXP470.1 à inhiber dans du BAL de souris contrôle de la mMMP-12 recombinante rajoutée à ce milieu. En effet, le BAL contient de nombreuses protéines et divers surfactants pouvant entraîner une capture non-spécifique de l'inhibiteur, aboutissant à fortement diminuer la concentration libre d'inhibiteur pouvant bloquer la MMP-12. Ces expériences révèlent qu'il une concentration de 1 μ M de RXP470.1 est nécessaire pour observer une extinction complète du signal dû au marquage de la MMP-12 recombinante par la sonde **2**, dans cette expérience de compétition réalisée dans du BAL (Figure 96). Une estimation d' IC_{50} de 22 nM est obtenue dans ces conditions.

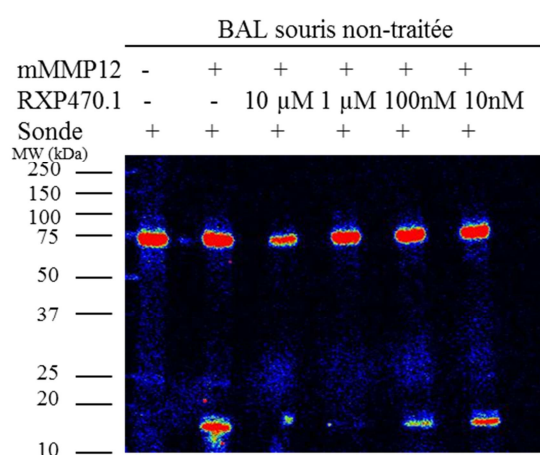


Figure 96 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant la compétition de la mMMP-12 recombinante (1 nM, 16 fmol déposées) par différentes concentrations RXP470.1 (10 nM, 100 nM, 1 μ M et 10 μ M) et le marquage par la sonde **2** (100 nM) dans du BAL de souris non-traitée (1,4 μ g de protéines totales)

Comme le montre la Figure 97, une compétition du marquage de la bande à 25 kDa par le RXP470.1 est observée dans les BAL des animaux exposés aux nanoparticules, compétition qui est dose dépendante. L'augmentation de la concentration du RXP470.1 dans ces BAL, avant l'addition de la sonde **2**, engendre effectivement une forte diminution du signal de radioactivité observé pour la bande à 25 kDa. Les valeurs moyennes d'inhibition observées en prenant en compte le traitement de six animaux sont présentées dans le Tableau 9 et confirment l'effet dose obtenu avec le RXP470.1. Ces données nous permettent donc de proposer que le marquage de la protéine à 25 kDa représente une modification covalente de la MMP-12 endogène présente dans le BAL des animaux traités par les

nanoparticules. Une estimation de l'IC₅₀ du RXP470.1 vis-à-vis de cette protéine donne une valeur de 57 nM, ce qui peut expliquer la nécessité d'utiliser une concentration de 10 µM de RXP470.1 pour éteindre totalement le signal observé. La sonde n'a pas les mêmes IC₅₀ pour les formes endogènes et recombinantes. Ceci peut être expliqué par la différence de poids moléculaire entre MMP-12 endogène et produite par voie recombinante dans ces expériences.

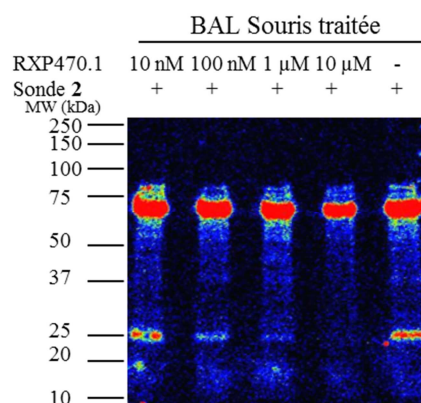


Figure 97 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant la compétition de la bande à 25 kDa par différentes concentrations de RXP470.1 (10 nM, 100 nM, 1 µM et 10 µM) et le marquage par la sonde 2 (100 nM) dans du BAL de souris traitée par les nanoparticules (2,9 µg de protéines totales)

Comme remarqué ci-dessus, la sonde **2** marque aussi une protéine au-dessus de 72 kDa, cependant dans ce cas ayant seulement observé une extinction partielle, mais qui n'est pas dose dépendante de cette bande par compétition avec le RXP470.1, nous excluons que cette protéine puisse représenter une forme putative de la MMP-12 de haut poids moléculaire. Les formes murines de la MMP-9 et de la MMP-2 sont connues pour migrer dans leur version active vers 95 kDa et 62 kDa, cependant nous n'avons pas pu observer ces bandes par zymographie de gélatine, une technique pourtant extrêmement sensible pour détecter ces deux MMP. Donc l'identité de la protéine migrant au-dessus de 72 kDa n'est pas attribuable.

Tableau 9 : pourcentage de marquage de la protéine à 25 kDa en fonction de la concentration en RXP470.1, moyenne pour 6 souris exposées aux nanoparticules

concentration en RXP470.1	10 nM	100 nM	1 µM	10 µM
pourcentage d'inhibition (%)	11	58	80	95

Les activités caséinolytiques des BAL ont été évaluées par zymographie. En accord avec les observations faites dans la littérature,¹⁹² la présence d'une protéine capable de dégrader ce substrat à un poids moléculaire de 25 kDa a été détectée (Figure 98). La

présence de cette protéine uniquement chez les souris traitées aux nanoparticules correspond par ailleurs à l'observation faite en radioimagerie avec le traitement de la sonde. Il faut cependant rappeler que l'activité observée en zymographie de caséine correspond à l'ensemble des formes de protéines actives présentes dans ces milieux, à savoir les formes actives libres et les formes actives en complexe avec les inhibiteurs naturels, tandis que notre sonde est capable de marquer uniquement les formes actives libres des MMP.

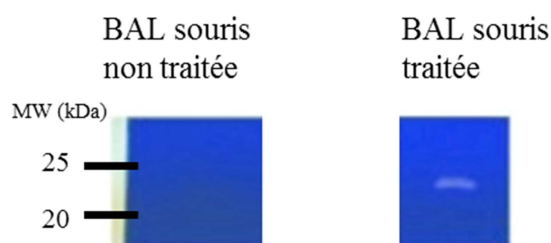


Figure 98 : zymographie de caséine des BAL d'une souris non traitée (2,7 μ g) et d'une souris traitée (10,7 μ g)

Afin de conforter nos conclusions sur la MMP-12, les mêmes expériences ont été répétées avec des souris n'exprimant pas la MMP-12 (KO MMP-12). On peut voir dans ces échantillons traités avec la sonde **2** une forte diminution du signal à 25 kDa, mais non une extinction complète du signal (Figure 99). Des expériences de compétitions réalisées avec le RXP470.1 sur quatre souris KO MMP-12 n'indiquent pas d'inhibition statistiquement significative de ce signal (Figure 100). Donc ce signal résiduel pourrait provenir du domaine catalytique d'une autre MMP, peu sensible au RXP470.1.

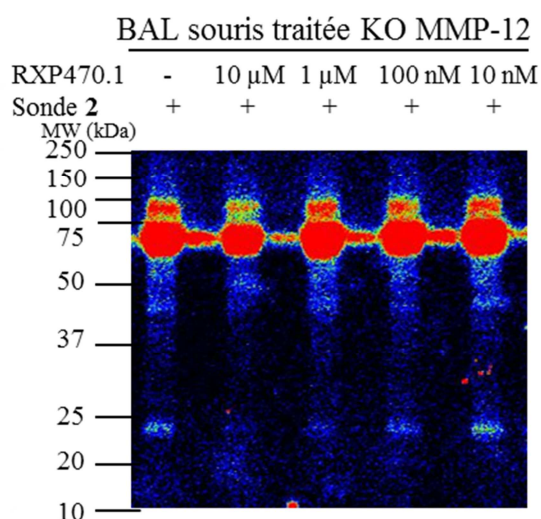


Figure 99 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant la compétition de la bande à 25 kDa par différentes concentrations de RXP470.1 (10 nM, 100 nM, 1 μ M et 10 μ M) et marquage par la sonde **2** (100 nM) dans du BAL d'une souris KO MMP-12, traitée par les nanoparticules (4,16 μ g de protéines totales)

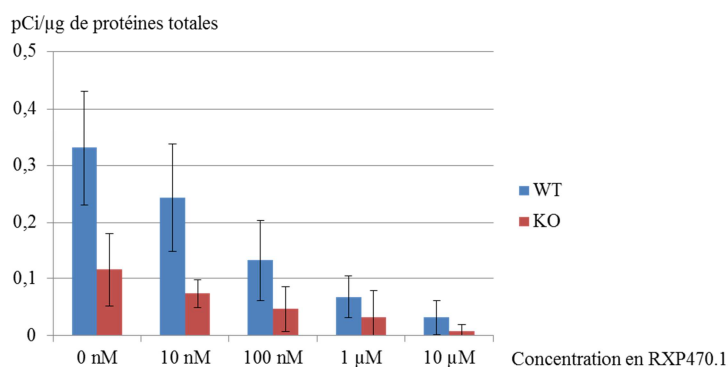


Figure 100 : comparaison de la quantité de radioactivité (pCi par μ g de protéines totales) de la bande à 25 kDa en fonction de la concentration en RXP470.1 chez les souris exposées WT (bleu) et KO MMP-12 (rouge). Moyenne de 6 souris WT et 4 souris KO MMP-12

Les résultats présentés ci-dessus révèlent la présence de mMMP-12 sous forme active dans les BAL des animaux exposés aux nanoparticules, ce qui indique l'absence dans ces BAL d'inhibiteurs naturels des MMP, les TIMP, ainsi que l'absence d'inhibiteurs naturels non-spécifiques des protéases, comme l' α -macroglobuline. Pour démontrer l'absence d' α -macroglobuline dans ces milieux, nous avons montré que si nous ajoutons de l' α -macroglobuline ainsi que de la mMMP-12 recombinante dans ces BAL, puis traitons les échantillons normalement avec la sonde, nous pouvions alors observer une nouvelle bande radiomarkée vers 150 kDa, au poids moléculaire attendu pour les monomères d' α -macroglobuline. De façon très intéressante, suite à l'addition d' α -macroglobuline, on observe une forte diminution du signal à 25 kDa dans les BAL, indiquant que la bande à 25 kDa est bien une protéase pouvant cliver le peptide « appât » de l' α -macroglobuline et ainsi être capturée par l' α -macroglobuline. Lors de l'ajout de 10 nM de mMMP-12 recombinante, le signal de la bande à 25 kDa est diminué de 40 % et le signal de la mMMP-12 est diminué de 88 %. Le fait que toutes les MMP recombinantes et endogènes n'aient pas été complètement prises en charge par l' α -macroglobuline est peut être dû à la grande quantité d'enzyme recombinante ajoutée au milieu. Cette capture des protéases par l' α -macroglobuline inhibe leur incapacité à cliver des substrats macromoléculaires, car les protéases ainsi piégées se retrouvent dans une cavité inaccessible à de tels substrats. En revanche, des petits substrats peuvent toujours accéder au site actif des protéases piégées par l' α -macroglobuline et être ainsi clivés normalement, car le site actif des protéases piégées reste fonctionnel. Donc notre sonde, pour les mêmes raisons doit pouvoir accéder au site actif de la mMMP-12 lorsqu'elle est piégée et donc marquer l' α -macroglobuline en complexe avec la mMMP-12. C'est exactement ce que nous avons observé. L'expérience de compétition réalisée avec le RXP470.1 confirme que c'est bien la MMP-12 qui a été piégée

par l' α -macroglobuline, puisque que dans ces conditions plus aucun signal n'apparaît à 150 kDa, pas plus qu'à 25 kDa, comme attendu.

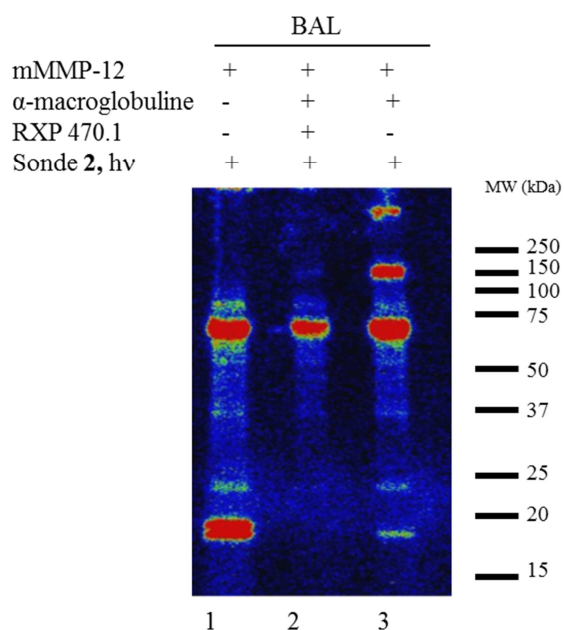


Figure 101 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant le BAL en présence de mMMP-12 recombinante (10 nM) et de sonde (100 nM) (piste1) BAL en présence mMMP-12 recombinante (10 nM), d' α -macroglobuline (760 nM) et de RXP470.1 (10 μ M, piste 2) et BAL en présence de mMMP-12 recombinante (10 nM), d' α -macroglobuline (760 nM) (piste3)

Il est intéressant de comparer notre système de détection avec ceux usuellement utilisés pour la détection de MMP, notamment en Western Blot et à l'aide des substrats fluorescents pour les formes actives.

En effet, nous avons réalisé des tests d'activité avec un substrat fluorescent spécifique de la MMP-12 dans les BAL. Cette activité a été comparée à l'activité mesurée après incubation en présence de RXP470.1, la différence entre ces deux activités mesurées correspond à une activité spécifique de la MMP-12. En présence de 0,6 μ g à 2 μ g de protéines totales, il est intéressant de remarquer qu'une activité est effectivement détectée dans ces milieux, mais seulement 17 % du signal est inhibable par 10 μ M de RXP470.1. Ceci implique que seule une très faible quantité d'activité spécifique est mesurée par ce système de détection. On peut seulement noter que l'activité détectée dans les BAL issus des souris non-traitées est nettement plus faible que celle détectée dans les BAL issus de souris traitées aux nanoparticules.

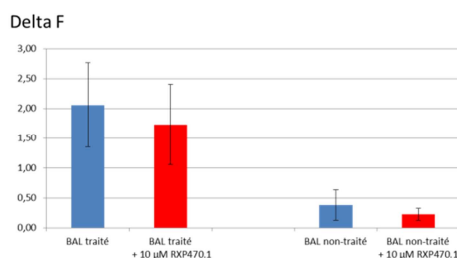


Figure 102 : moyenne de l'activité enzymatique mesurée à l'aide d'un substrat spécifique MMP-12 (Delta F) dans les BAL traités (moyenne sur 6 souris) ou non traités (moyenne sur 4 souris) par les nanoparticules en absence (bleu) ou en présence de RXP470.1 (10 µM, rouge)

Il semble ainsi que le signal détecté avec ce substrat fluorescent soit dû à des activités protéolytiques présentes dans le milieu autres que celles provenant des MMP, probablement induites lors de l'inflammation par les nanoparticules. La présence de ces protéases ne permet pas la détection de la MMP-12 dans ce cas.

Par ailleurs, les membranes PVDF analysées en radioimagerie ont aussi été traitées pour une révélation en Western Blot, par un anticorps polyclonal dirigé contre le domaine catalytique de la MMP-12 murine (Figure 103). On peut noter la présence de deux signaux à 55 kDa et 70 kDa, observés à la fois chez les souris traitées et les souris non-traitées. Le signal détecté à 70 kDa correspond à la protéine très marquée avec la sonde en radioimagerie, attribuée à la sérum albumine. De façon intéressante, la bande observée à 55 kDa n'est pas détectée par notre sonde. Il est important de rappeler que la détection en Western Blot par des anticorps n'a rien de spécifique des formes actives ; il pourrait donc s'agir d'une forme inactive de MMP-12, non détectable par la sonde. En revanche, contrairement à la radioimagerie, aucun signal n'est détecté à 25 kDa. Il est probable que l'absence de signal provienne d'un défaut de sensibilité de la méthode Western Blot. En effet, la sensibilité de détection en Western Blot a été estimée à 30 ng pour la forme recombinante de MMP-12 murine, or il n'a été déposé sur ces membranes, selon les quantités estimées par radioimagerie, que 0,23 ng (9 femtomoles) de MMP endogène à 25 kDa. L'échec dans la détection de cette bande par Western Blot souligne tout l'intérêt de notre stratégie, dont la sensibilité extrêmement importante permet de détecter des quantités inaccessibles en Western Blot.

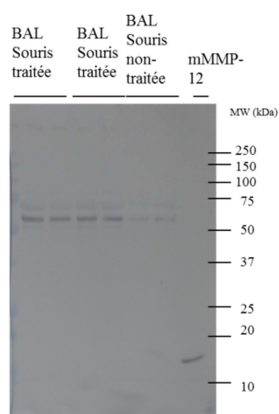


Figure 103 : membrane PVDF analysée en Western Blot des BAL de souris traitées ou non-traitées, avec un anticorps dirigé contre le domaine catalytique de la MMP-12 murine (quantité de protéines déposée respectivement de gauche à droite : 4,8 µg, 4,8 µg, 4 µg, 4 µg, 1 µg, 1 µg, 50 ng)

III. 3. Etude des carotides et aortes humaines

L'expression de MMP au cours de l'athérosclérose chez l'homme a été largement reportée et débattue dans la littérature. Cependant, les mêmes questions se posent pour toutes ces études quant à la détection de seules formes actives des MMP dans ces tissus. Les résultats que nous avons obtenus dans les BAL nous ont incités à essayer de détecter des formes actives de MMP avec la sonde **2**, d'autant que l'expression de la MMP-12, notamment par les macrophages se situant dans la plaque, a été reportée dans la littérature.

Par rapport au BAL, la manipulation de carotides ou d'aortes humaines pose au moins deux difficultés majeures qui peuvent compromettre toute possibilité de détection des métalloprotéases. D'une part le matériel auquel nous avons eu accès provient de prélèvements qui ont été faits au cours d'intervention chirurgicale et qui ont été conservés à - 80 °C pendant parfois plusieurs années, des conditions ne garantissant pas la préservation de formes actives de MMP. On sait par exemple qu'après quelques mois les formes recombinantes de MMP-9 conservées à - 80 °C présentent un taux d'autolyse extrêmement important conduisant à la disparition de la forme initiale de haut poids moléculaire de cette protéine. Par ailleurs, les artères humaines sont un matériel difficile à manipuler, ayant tendance à former une pâte s'apparentant à du « chewing-gum » duquel il est difficile d'extraire les MMP. Il est reporté dans la littérature que les MMP en présence de matrice extracellulaire ont tendance à interagir fortement avec celle-ci et deviennent ainsi difficilement isolables sans le recours à des méthodes d'extraction assez énergiques, qui si elles permettent de mieux isoler les MMP, ne sont pas sans conséquences sur le maintien de l'activité de ces protéases.

Sur la base de ces réflexions, nous avons cherché à mettre en œuvre un protocole permettant une extraction à la fois efficace et susceptible de maintenir l'activité des MMP,

ou tout du moins celle de la MMP-12, quand elle est sous forme de domaine catalytique. L'expression des MMP sous formes recombinantes nous a appris que dans un tampon 2 M urée, le domaine catalytique de la MMP-12 reste parfaitement replié et fonctionnel. En effet, si on prélève de la MMP-12 d'une telle solution pour réaliser un test d'activité, où la MMP-12 va certes subir une forte dilution changeant toutes les conditions physico-chimiques, on observe une activité maximale, laissant penser qu'il existe bien dans l'urée un repliement qui est fonctionnel. Ces données nous ont donc incités à retenir un protocole précédemment utilisé pour faire des extractions de MMP, sans que dans ce cas, la question du maintien de l'activité enzymatique n'ait été posée dans cette étude. Cependant, avant d'adopter ce protocole, il fallait aussi qu'il soit validé vis-à-vis de la sonde, en n'altérant pas sa capacité à modifier la MMP-12.

La Figure 104 compare l'efficacité de la sonde **2** à photomarquer la hMMP-12 dans des conditions de tampon classique et en présence d'urée et de 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases (non-MMP), rajouté pour bloquer les activités protéolytiques autres que celles des MMP. La comparaison de l'intensité du signal de radioactivité entre ces deux expériences indique que l'urée n'a que peu d'influence sur le rendement de marquage, puisque celui observé en présence d'urée représente 90 % du marquage obtenu en condition standard.

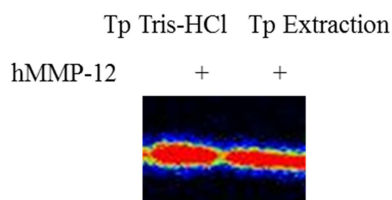


Figure 104 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant le marquage de la hMMP-12 (2 nM) par la sonde (100 nM) dans un tampon 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,01 % brij-35, pH 6,8 et dans un tampon 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 0,1% brij-35, 2 M Urée, 1 M NaCl, cocktail d'inhibiteurs Sigma P8340 (1 %) pH 6,8 (32 fmol déposées sur le gel SDS-PAGE)

Brièvement, pour le traitement des artères, carotides et aortes, le protocole a consisté après décongélation des échantillons, à les couper en petits morceaux sur de la glace, puis à incubé ces morceaux pendant 30 min dans le tampon d'extraction et enfin à centrifuger à 10 000 g pendant 1 h les échantillons, pour récupérer le surnageant.

Cette étape d'extraction dans le tampon contenant l'urée a été testée avec deux conditions, en absence ou en présence de sonde **2**. Dans le deuxième protocole, dès que les MMP passent dans le tampon d'extraction, elles se retrouvent en présence de la sonde, un moyen de former au plus tôt les complexes MMP/sonde potentiels. Cependant, ce protocole

peut se heurter à une capture non spécifique de la sonde par l'ensemble des protéines qui passent dans la phase soluble, c'est-à-dire tous les composants tant extra que intracellulaires, mais aussi toute la partie non-soluble. Pour éviter cela, on peut préférer ajouter la sonde (protocole 1) qu'une fois la fraction insoluble éliminée par centrifugation.

Avant de commenter les résultats, il était important de vérifier que lorsque l'on ajoute de la hMMP-12 recombinante dans ces milieux, cette hMMP-12 est parfaitement modifiable par la sonde, ce qui valide la fonctionnalité de notre dispositif de détection dans ces conditions. D'autre part, on vérifie aussi que l'expérience de compétition en présence de 1 μ M de RXP470.1 entraîne une disparition totale du signal de radioactivité, indiquant que le RXP470.1 est, à cette concentration, en quantité suffisante pour bloquer totalement le site actif de la hMMP-12, sans déplacement par la sonde (100 nM). Ces expériences de validation sont reportées dans la Figure 105, il s'agit ici d'un protocole d'extraction à partir de carotides effectué sans ajout préalable de la sonde. L'interprétation selon le degré pathologique des échantillons (CP = culprit, NP = non pathologique) ne sera pas faite à ce stade de la discussion.

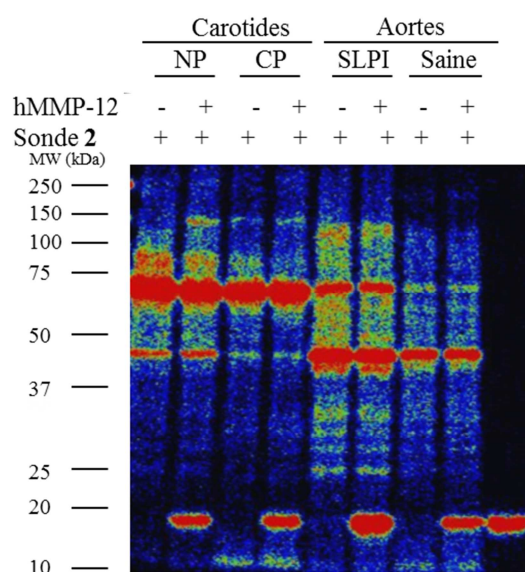


Figure 105 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant le marquage en absence ou en présence de hMMP-12 recombinante (5 nM) et de sonde (100 nM) dans des extraits de carotides (quantité de protéines déposée sur gel SDS-PAGE 12 % : 15 μ g pour les carotides NP, 30 μ g pour les carotides CP, 29 μ g pour les aortes SLPI, 12 μ g pour les aortes saines)

Dans la Figure 106 sont comparés des échantillons de carotides et d'aortes utilisant un protocole d'extraction « avec » ou « sans » sonde. Il semblerait que, dans ces expériences, le protocole sans sonde débouche sur des signaux plus intenses qu'avec le protocole où la sonde est présente pendant l'extraction. Comparées aux expériences réalisées avec des BAL, on remarque à nouveau la présence d'une bande intense vers 72 kDa, par contre aucune bande vers 25 kDa, mais une nouvelle bande vers 45 kDa.

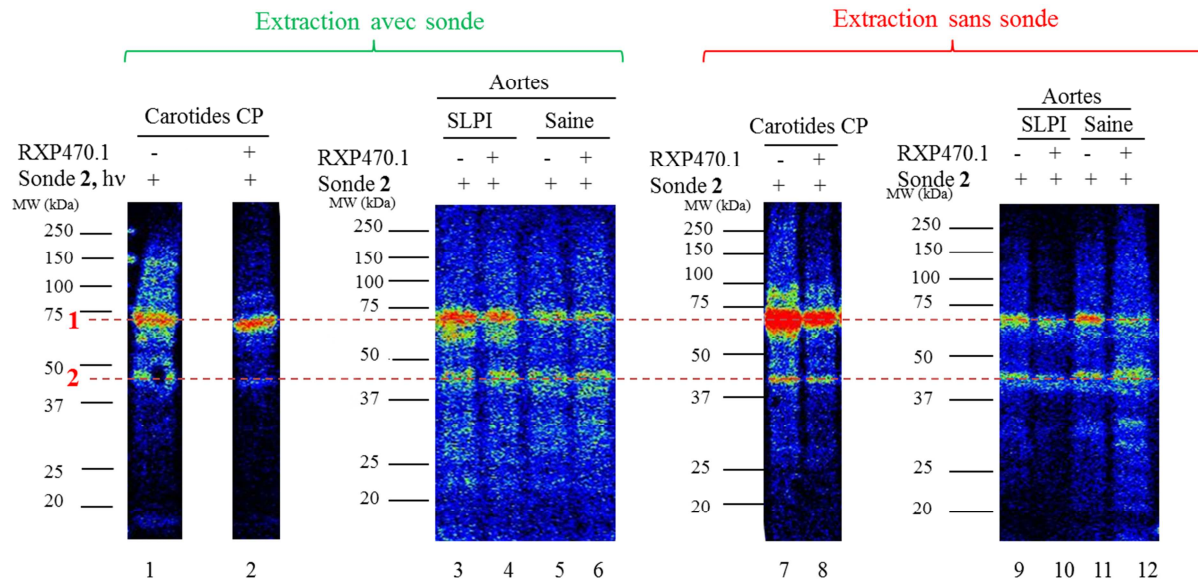


Figure 106 : membrane PVDF analysée en radioactivité montrant la comparaison du marquage observé dans les carotides CP, les aortes SLPI et saines, suite à une extraction avec sonde (100 nM) ou sans sonde, en absence ou en présence de RXP470.1 (10 μ M). Dépôt de 20 μ g de protéines (piste 1, 2, 7 à 12), 18 μ g de protéines (pistes 3 et 4), 29 μ g de protéines (pistes 5 et 6)

Tableau 10 : pourcentage d'inhibition du marquage des protéines à 72 kDa et 45 kDa, après traitement par 1 μ M de RXP470.1 sur les milieux, après extraction avec ou sans sonde

	Carotides		Aortes			
	CP		Saine	SLPI	Saine	SLPI
Pourcentage d'inhibition après incubation de 1 μ M de RXP470.1	Extraction avec sonde	Extraction sans sonde	Extraction avec sonde		Extraction sans sonde	
bande à 72 kDa (%)	0 %	40 %	0 %	40 %	33 %	24 %
bande à 45 kDa (%)	55 %	25 %	0 %	10 %	0 %	48 %

On remarque d'après le Tableau 10 que les expériences de compétition réalisées avec le RXP470.1 (1 μ M) n'entraînent au mieux que 50 % d'inhibition du marquage par la sonde des signaux observés à 72 kDa et 45 kDa, avec des résultats très variables d'un échantillon à l'autre. Bien entendu, on peut arguer qu'il s'agit d'échantillons très différents, carotides versus aortes, saines ou pathologiques, mais malgré ces différences, à l'intensité près, nous observons un profil de marquage très similaire, suggérant que l'on marque les mêmes protéines. En comparaison, dans les BAL, 1 μ M de RXP470.1 conduisait dans les expériences de compétition à 80 % d'inhibition de la bande à 25 kDa et ce, avec une très bonne reproductibilité du signal. Le signal observé à 72 kDa dans les BAL a été attribué au marquage de la sérum albumine, signal qui se caractérise aussi avec un effet de compétition faible du RXP470.1. Par association, pour des signaux situés à la même position dans le gel,

on peut penser que dans ces échantillons d'artères, nous marquons aussi la sérum albumine. Pour étayer cette proposition et éclaircir l'origine de la bande à 45 kDa, des expériences de zymographie en caséine et en gélatine ont été réalisées sur ces échantillons. Pour compléter ces expériences, des westerns blots ont été aussi réalisés avec anticorps polyclonaux dirigés contre le domaine catalytique de la forme humaine de la MMP-12.

L'ensemble de ces résultats est regroupé en Figure 107, à laquelle ont été ajoutés les gels d'électrophorèse colorés au nitrate d'argent.

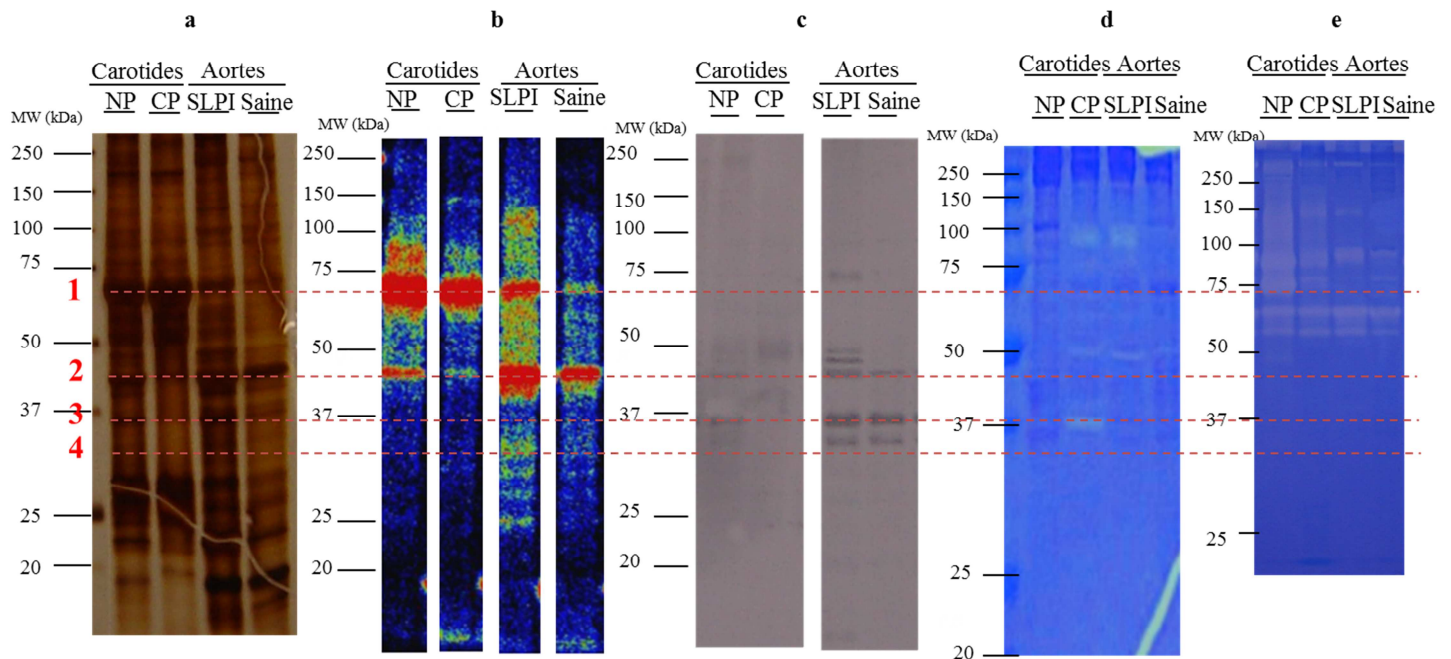


Figure 107 : analyse des échantillons de carotides NP (15 µg), carotide CP (30 µg), aorte SLPI (29 µg) et aorte saine (12 µg) a) gel SDS-PAGE 12 % révélé au nitrate d'argent b) image en radioactivité de la membrane PVDF obtenue après marquage par la sonde (100 nM) c) révélation en Western Blot par l'anticorps dirigé contre la hMMP-12 d) zymographie de caséine e) zymographie de gélatine

Les principales informations déductibles de ces résultats sont :

- la présence de trois activités protéolytiques migrant vers 37 kDa et 45 kDa et au-dessus de 75 kDa sont révélées par la zymographie de caséine (lignes 1, 2 et 3). On peut penser que les protéines observées en zymographie de caséine migrent plus lentement à cause de la présence de caséine qui freine la migration
- la reconnaissance des trois bandes (72, 45 et 37 kDa) par l'anticorps polyclonal suggère que nous sommes en présence de MMP-12, sous différentes formes (lignes 1, 2 et 3)
- les formes de la MMP-12 migrant vers 72 et 45 kDa sont marquées par la sonde (ligne 1-2), par contre pas celle migrant à 37 kDa (ligne 3)
- une forme de MMP-12 détectée par l'anticorps sous la bande à 37 kDa (ligne 4) donne un très faible signal en présence de la sonde, mais pas de signal en zymographie de caséine

- finalement le gel coloré à l'argent indique une grande quantité de protéines migrant à 72 et 45 kDa.

Sur les trois activités protéolytiques détectées en zymographie de caséine, seules les bandes migrant vers 75 kDa et 45 kDa donnent des signaux avec la sonde, et donc pourraient représenter des formes de MMP-12 car reconnues par l'anticorps polyclonal, et sont sous formes actives. Cette hypothèse repose toutefois sur la spécificité de cet anticorps. L'effet de compétition assez réduit observé par le RXP470.1 pourrait provenir d'un marquage radioactif de protéines très abondantes migrant à la même position, comme l'indique le gel SDS-PAGE révélé au nitrate d'argent. Sur le gel de zymographie de gélatine, la présence d'une bande vers 90 kDa pourrait correspondre au poids moléculaire attendu pour la proforme de la MMP-9, non marquée par notre sonde. De plus, les bandes à 60 kDa et 67 kDa pourraient aussi correspondre au poids moléculaire attendu respectivement pour les formes actives des MMP-2 et MMP-9. Cependant, aucune de ces formes ne semble marquée par la sonde. Pour la bande détectée à 37 kDa, celle-ci peut correspondre à une forme de MMP-12 en interaction avec un TIMP, expliquant pourquoi elle n'est pas détectée par la sonde. Finalement, une bande migrant en-dessous de 37 kDa pourrait aussi représenter une forme active de MMP-12, cependant elle doit être en faible quantité compte tenu du signal de la sonde.

IV. Discussion

Ce projet de recherche représente la continuité d'efforts consentis par plusieurs équipes dans le monde pour mettre au point des sondes ABP pouvant être utilisées pour détecter des formes actives de MMP, à la fois comme outil de recherche, et pour des expériences de validation des MMP pour des applications diagnostiques, voire thérapeutiques. Les enjeux sont donc très importants, notamment parce que les MMP se trouvent au centre de nombreuses pathologies humaines. Cependant, malgré le développement de nombreuses ABP conçues pour cibler les MMP, jusqu'à présent aucune n'a pu être utilisée dans de telles applications : à ce jour, la détection de formes endogènes de MMP sous formes actives n'a jamais été reportée dans la littérature, à l'exception de modèles cellulaires, mais rien à partir modèles animaux ou d'échantillons humains.

Les résultats que nous avons obtenus pour l'analyse des BAL d'animaux exposés à des nanoparticules permettent de situer la difficulté pour réaliser ces objectifs. En effet, comme suggéré dans la littérature, et maintenant explicité dans ce travail, les quantités de matériel protéique à détecter sont extrêmement faibles. Ainsi, nous pouvons déduire de nos expériences que, dans ce modèle animal induisant pourtant une réaction d'inflammation aigüe, les concentrations de MMP-12 sous forme active sont de l'ordre de 1 nM dans les BAL. Cela représente 1 femtomole de MMP-12 par μL de BAL, soit exactement la limite de détection de notre sonde pour la forme murine de la MMP-12. Dans nos expériences, nous avons utilisé 8 μL de BAL, quantité nous situant donc au-dessus de notre seuil de détection. Nous aurions pu envisager d'utiliser un plus grand volume de BAL et reconcentrer les échantillons par lyophilisation, par exemple. Cependant ces étapes de concentrations nous paraissent à éviter si possible, car elles conduisent très souvent sur une perte de matériel, avec le risque que durant la concentration de l'échantillon les phénomènes d'autolyse ou de lyse par les protéases présentes altèrent profondément celui-ci et puissent conduire à des conclusions erronées.

La sensibilité de détection, placée au centre de ce projet de recherche, que nous reportons pour la sonde **2**, dépend de trois éléments qui sont au cœur de la conception de cette sonde :

- a) l'utilisation d'un motif de type « peptide phosphinique » pour contrôler l'affinité de la sonde vis-à-vis des MMP et sa sélectivité d'interaction.
- b) la position du groupement photoactivable dans le fond de la cavité S_1' de façon à limiter les réactions entre sonde et molécules d'eau, mais en favorisant la

modification de résidus des MMP par une proximité spatiale entre ceux-ci et le groupement photoactivable

- c) l'utilisation d'une méthode de détection ultrasensible, c'est-à-dire la radioactivité.

Le premier point est très important car seule une très bonne affinité permet de limiter les quantités de sonde à utiliser et donc de minimiser les interactions non-spécifiques. Même avec des affinités nanomolaires, on est amené à utiliser des concentrations de 100 nM de sonde pour parvenir à 100 % de formation du complexe non-covalent en conditions de tampon, mais dès que l'on passe en mélange complexe, la présence de plusieurs protéines endogènes en très forte abondance comme la sérum albumine entraîne une capture partielle de la sonde, limitant la concentration de la fraction libre et donc la fraction de formes actives de MMP pouvant être inhibée par la sonde. On peut alors soit garder cette concentration, qui risque de limiter le pourcentage de marquage (notre option), soit accroître les concentrations de la sonde avec le risque d'augmenter les marquages non-spécifiques. La sélectivité de la sonde est un autre aspect important, car outre qu'une faible sélectivité peut conduire à l'observation de faux positifs, elle augmente aussi l'intensité du bruit de fond et donc diminue la qualité du rapport signal/bruit. Nous avons signalé précédemment comment l'utilisation d'inhibiteurs hydroxamates dans de nombreuses sondes ABP a conduit à des marquages non sélectifs de métalloprotéases, n'ayant rien à voir avec les MMP, mais aussi à une intensité du bruit de fond très important, renforcé par l'utilisation de la fluorescence comme moyen de détection.¹⁷⁵ En revanche, l'utilisation de peptide phosphinique permet de développer des sondes ayant une très bonne sélectivité, avec pour première explication, le très faible pouvoir chélatant du groupement PO_2^- vis-à-vis du zinc, expliquant par exemple le développement du premier inhibiteur très sélectif de la MMP-12 grâce à cette famille d'inhibiteurs.¹³⁰ Dans notre travail, au moins pour trois mélanges complexes différents (extrait cytosolique de macrophage, BAL et extraits d'artères humaines), le nombre de protéines radiomarquées par la sonde **2** reste réduit dans toutes ces expériences, avec un rapport signal/bruit tout à fait satisfaisant, arguant pour une très bonne sélectivité de la sonde. Son inaptitude à marquer les MMP, qui pourrait aussi être une explication pour le faible nombre de protéines marquées, n'est pas retenue dans notre cas, puisque la MMP-12 est marquée, alors que c'est une des MMP possédant un faible rendement de photomarquage par la sonde **2**.

Sur le deuxième point, le choix du groupement photoactivable et son emplacement dans la cavité, ce projet a tiré parti de l'expertise acquise depuis des années par le groupe sur le développement de peptide phosphinique possédant notamment des chaînes latérales

en position P_1' très longues. Cette expertise a permis d'assurer le développement des sondes et l'emplacement du groupement photoactivable sans craindre de sacrifier les affinités. Cette remarque explique aussi pourquoi nous sommes le seul groupe dans le monde à avoir choisi cette stratégie pour développer des sondes ABP des MMP. Si le groupement benzophénone pouvait être exclu en première intention pour des raisons stériques, entre azoture et diazirine, aucun argument fort ne pouvait être pris en compte pour sélectionner le meilleur groupement. *A posteriori*, nous pouvons aujourd'hui expliquer pourquoi le groupement diazirine se révèle, dans le cas des MMP, supérieur au groupement azoture en termes de rendements de marquage. Le groupement diazirine se comporte finalement comme on aurait pu l'espérer d'après la littérature, avec une capacité à très bien réagir avec de nombreux acides aminés, capable de modifier aussi bien des atomes du squelette, que des atomes des chaînes latérales. Le groupement azoture *a posteriori*, comme expliqué plus haut, s'est révélé très performant pour deux MMP, les hMMP-12 et hMMP-3 (seulement pour les formes humaines mais pas pour les formes murines) et beaucoup moins efficace pour les autres MMP.^{186,187} Une autre difficulté à laquelle doit faire face une sonde munie d'un groupement photoactivable est la présence de variation des résidus composant le site actif entre formes humaines et murines. Nous n'avons pas été capables dans le cas de la sonde diazirine d'identifier le(s) résidu(s) modifié(s) par la sonde **2** dans les MMP, ce qui aurait pu nous procurer des informations pour expliquer les différences de rendements entre MMP, la chimie de modification exacte mise en jeu et des données structurales et dynamiques de la protéine modifiée. En effet, dans le cas de la MMP-12 humaine, avec la première sonde développée au laboratoire, la caractérisation précise du lieu de la modification chimique a permis de démontrer que le groupement ϵ NH_2 de la lysine pouvait se replier sur la cavité S_1' de cette MMP et être ainsi modifié par le nitrène. Cette donnée structurale et dynamique a été par la suite confirmée dans des structures cristallographiques, obtenues au laboratoire, de complexes de la MMP-12 en interaction avec des inhibiteurs portant des chaînes en position P_1' très longues, montrant effectivement une position de la chaîne latérale de la lysine au-dessus de la cavité S_1' en interaction avec la partie distale de la chaîne en position P_1' . Les données que nous avons obtenues avec les mutants de la hMMP-12 nous conduisent à formuler l'hypothèse que le site de modification par la sonde **2** pourrait être au niveau du squelette de la position 241 ou d'un résidu très proche, expliquant des rendements de modification beaucoup moins sensibles à la nature du résidu présent dans cette position, que ce que nous avons observé pour la sonde **1**.

Finalement, le choix de la radioactivité comme mode de détection a été aussi déterminant, à la fois pour la sensibilité de détection qu'elle offre, mais aussi grâce à

l'utilisation d'un radioimageur permettant de compter les désintégrations et donc de quantifier les intensités observées sur les membranes, facilitant l'interprétation des données. Un autre avantage non négligeable par rapport à la fluorescence est que ce tag ne modifie pas la structure de la sonde et n'introduit pas de groupement posant des problèmes stériques et de solubilité des échantillons imposés par certains groupements fluorescents particulièrement apolaires. Afin de remédier à ces difficultés, il a été proposé d'introduire le groupement fluorescent après l'étape modification des protéines par une sonde par chimie click.¹⁷⁶ Cette option est certes très intéressante, mais elle rajoute une étape supplémentaire dans le protocole de marquage et peut en elle-même poser des problèmes sur les rendements d'incorporation du groupement fluorescent.

Les propriétés de la sonde discutées ci-dessus expliquent certainement pourquoi finalement nous avons pu observer pour la première fois le marquage d'une forme endogène de MMP-12. A la base de cette réussite, l'accessibilité immédiate des échantillons prélevés chez la souris a certainement été un facteur déterminant. En revanche, l'analyse des extraits d'artères humaines reste limitée et ne permet pas de conclure de façon définitive. On peut supposer que se rajoute à la question de la « fraîcheur » des échantillons, la présence possible d'une plus grande complexité en quantité de protéines dans les extraits d'artère, pouvant augmenter les marquages non-spécifiques ou bien entraîner un phénomène de capture non-spécifique de la sonde. A cet égard, le marquage de la sérum albumine reste un problème seulement partiellement résolu, qui s'est avéré gênant dans notre étude, car le poids moléculaire apparent de ce marquage vers 75 kDa est dans une zone correspondant aux formes actives de certaines MMP, comme les MMP-2 et MMP-9. Il est très difficile d'éviter la liaison de composés chimiques à la sérum albumine, surtout lorsqu'ils possèdent des parties apolaires. A ce stade, maintenant que nous avons validé la capacité de la sonde **2** à détecter des formes actives de MMP, nous pourrions envisager de faire une petite librairie d'analogues de la sonde **2** en faisant varier par exemple la position P₃' de la sonde et faire un criblage basé sur le pourcentage de capture des analogues à la sérum albumine.

Notre approche est aujourd'hui limitée à la disponibilité d'inhibiteurs hautement sélectifs des MMP, en effet la visualisation d'une bande radioactive ne peut suffire à identifier la MMP concernée à partir du seul poids moléculaire. La disponibilité au sein du laboratoire d'un inhibiteur hautement sélectif de la MMP-12 nous a orienté à choisir un modèle animal impliquant l'expression de cette MMP. Les expériences de compétition se sont révélées à cet égard très utiles pour étayer notre identification de la MMP-12 dans les BAL. Cette identification a pu bénéficier aussi de l'accès aux souris MMP-12^{-/-}. Les données concernant le poids moléculaire de la forme active de la MMP détectée sont très

intéressantes dans notre approche. En effet, il a été largement débattu dans la littérature que la MMP-12 constituait une exception au sein de la famille des MMP, à cause de l'existence d'un clivage prenant place dès que la protéase s'active entre le domaine catalytique et le domaine hémapexine. Cette proposition a été essentiellement validée par la détection de la MMP-12 au poids moléculaire correspondant à son domaine catalytique en utilisant des anticorps. Cependant, de telles observations, si elles prouvent bien l'existence de ce clivage, ne disent rien en revanche quant à la présence de ce domaine catalytique sous forme active à ce poids moléculaire. L'utilisation de la sonde **2** indique très clairement que la MMP-12 dans les BAL est présente sous forme d'un domaine catalytique fonctionnel. Ce type d'information n'est pas toujours accessible dans les études de protéomique par spectrométrie de masse, notamment pour des protéines multi-domaines comme les MMP. La détection de peptides couvrant tous les domaines peut correspondre à différentes situations, formes entières seules, mélange de formes entières en présence de domaine catalytique, une situation ne permettant pas de conclure à la présence de domaine catalytique seul de façon univoque.^{193,194} Concernant la présence de MMP-12 à la surface des macrophages, comme cela a été reporté en analysant aussi des BAL de souris exposées à des polluants et en utilisant des substrats synthétiques s'incorporant à la surface des macrophages, mais nos résultats ne semblent pas concorder avec ces observations.¹⁹⁵ Cependant, il n'est pas exclu que nous ayons perdu les formes actives de MMP-12 lors de la préparation des culots membranaires des macrophages présents dans les BAL.

Sur la base de la sensibilité de la sonde **2** et des quantités reportées chez l'homme dans des BAL de patients atteints de BPCO, en prenant la partie basse de ces estimations, soit 1 ng/mL, nous pouvons conclure que cette sonde devrait être adaptée pour détecter de la MMP-12 dans ces échantillons. Avec 200 µL de lavage, représentant 200 pg de MMP-12, et compte tenu du seuil de détection de 25 pg pour cette sonde, la détection de MMP-12 devrait être possible. La relation entre fonction respiratoire du patient et quantité de forme active de MMP-12 reste discutée dans la littérature, mais comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, les outils à base de capture d'anticorps restent peut être pour l'instant mal adaptés pour quantifier des formes fonctionnelles de protéases et permettre de formuler des conclusions définitives.

Conclusion générale

Cette étude reporte pour la première fois la détection de forme active de MMP-12 dans un fluide obtenu à partir d'un modèle animal, mimant une pathologie humaine. Ce travail démontre que le recours à des sondes photoactivables implique de tester la réactivité des groupements choisis qui influence finalement la sensibilité de la sonde. Ce paramètre est essentiel, car comme nous l'avons démontré dans cette étude les quantités de formes actives de MMP sont extrêmement faibles. A moins de reconcentrer les échantillons à analyser, la faiblesse des quantités de MMP sous formes actives rendent la plupart des systèmes de détection classiquement utilisés inopérants, même la spectrométrie de masse. La zymographie en gélatine est la seule à rivaliser avec le seuil de détection obtenu avec la sonde reportée dans cette étude, cependant comme nous l'avons précisé, elle ne permet pas de distinguer entre formes actives « libres » ou en interactions avec des TIMP et reste dédiée aux seules gélatinases (MMP-2 et MMP-9).¹⁹⁶ Par ailleurs, cette technique est beaucoup plus difficilement quantifiable que notre approche.

Pour le futur proche, la sonde **2** mise au point dans ce projet va pouvoir être utilisée pour tester la capacité d'inhibiteurs de la MMP-12 à, d'une part, passer dans le fluide alvéolaire après injection sous cutanée, et d'autre part, à bloquer effectivement le site actif de la MMP-12. Il suffira dans ces conditions d'ajouter la sonde et de vérifier l'absence de marquage de la MMP-12. Si l'inhibiteur arrive dans ce compartiment à la concentration utile, il bloquera ainsi l'accès de la sonde au site actif de la MMP-12. Sur le même principe, on pourra réaliser des effets doses pour déterminer la quantité d'inhibiteur devant être utilisée pour avoir un effet thérapeutique optimal pour l'inhibiteur. C'est en effet, une des utilisations les plus intéressantes des sondes ABP pour valider *in vivo* la sélectivité d'interaction d'une drogue. Nous avons développé récemment dans le laboratoire de nouveaux inhibiteurs de MMP-12, et cette nouvelle sonde sera donc particulièrement utile pour les valider et choisir dans une série les mieux adaptés pour cibler un compartiment/organe précis.

Le recours à une photoactivation reste évidemment un handicap et limite l'utilisation de la sonde **2** pour des applications *in vivo*. L'absence d'atomes nucléophiles dans le site actif des MMP pouvant être la cible d'un groupe électrophile nous contraint à recourir à des groupements photoactivables pour développer des sondes ABP. Il sera peut être possible avec le développement des nanotechnologies de faire des photoactivations *in situ*, en utilisant des atomes capables d'émettre des photons dans le spectre d'absorption des groupements photoactivables, avec les énergies requises. Alternativement, on pourrait penser à accorder les énergies d'activation de certains groupements photoactivables, par

modification chimique, aux énergies d'atomes émettant de photons, notamment pour la plupart des atomes utilisés en médecine nucléaire.¹⁹⁷

Nous avons présenté une application dans les BAL de souris comme exemple positif d'utilisation de la sonde et des résultats plus mitigés pour les extraits d'artère. On pourrait proposer de tester dans ce cas différentes conditions d'extraction, si la quantité de matériel n'est pas trop limitée. Des fluides biologiques, ne nécessitant pas un traitement préalable, constituent un échantillon de choix par rapport à des extraits d'organe. Les travaux initiés à ce jour avec la sonde **2** visent ce type d'échantillons, avec des *sputa* de patients BPCO et des lavages bronchoalvéolaires de patients atteints de mucoviscidose. D'autres fluides sont envisageables : en effet la présence de MMP dans des fluides comme le plasma et les urines est reportée dans de nombreuses études actuellement et pour des pathologies différentes. Dans le plasma, la détection est beaucoup plus difficile, tout du moins pour les formes activées de MMP, puisqu'une fois activée, elles peuvent être capturées par l' α -macroglobuline. Nous avons vu que de tels complexes sont détectables par la sonde **2**, cependant à moins d'avoir une sonde très sélective pour une MMP particulière, l'identité de la MMP capturée ne peut être établie. Dans ce cas, des analyses en spectrométrie de masse en isolant l' α -macroglobuline pourraient procurer une réponse.

Ce travail valide l'utilisation de la sonde **2** pour d'autres applications où la MMP-12 est sur-exprimée (BPCO, athérosclérose, cancer, et autres pathologies à composante inflammatoire), mais aussi d'autres MMP. Ce projet pourra par la suite évoluer vers deux directions opposées, ou bien la conception de sondes extrêmement sélective d'une forme de MMP particulière, comme la MMP-12, ou bien à l'opposé capable de cibler des membres de la famille des ADAM ou des ADAMTS. Cette dernière option correspond à une nécessité d'avoir une lecture la plus large possible des protéases exprimées à un moment donné, puisqu'il est admis dans la littérature que les protéases puissent agir en synergie. Dans ce cas, la détection à partir de gel d'électrophorèse devra être complétée par des analyses en spectrométrie de masse, seules à gérer l'analyse d'une grande diversité de protéines. Il faudra certainement après la phase de formation des complexes covalents concentrer les échantillons de façon sélective, de façon à avoir les quantités nécessaires pour ces analyses.

I. Synthèse chimique de la sonde

I. 1. Méthodes d'analyses en chimie

I. 1. a) HPLC

Les séparations par HPLC préparative ont été réalisées sur un appareil Gilson avec une colonne AIT C18 Kromasil (10 μ m, 100 Å, 250 x 10 mm, débit 3 mL/min). L'analyse des composés s'est effectuée sur un appareil Thermo Separation Product utilisant une colonne Ascentis Express (100 Å, 10cm x 4,6 mm x 2,7mm, débit 1,8 mL/min) ou sur un appareil Shimadzu avec une colonne Hypersil C-18 (8 μ m, 300 Å, 250 x 4,6 mm, débit : 1 mL/min, gradient de 0 à 30 min / 0 à 100 % B). La longueur d'onde utilisée pour la détection en UV des produits est 230 nm ou 280 nm. Les solvants d'élutions sont les suivants : A = H₂O / CH₃CN / TFA : 90% / 10% / 0,1% et B = CH₃CN / H₂O / TFA : 90% / 10% / 0,09%.

La séparation et l'analyse par HPLC des produits radioactifs a été réalisé sur un appareillage Hitachi Elite LaChrom (VWR) sur une colonne Waters Atlantis C18 (5 μ m, 100 Å, 4,6 cm x 250 mm, débit 1,2 mL / min, gradient de 0 à 30 min / 0 à 100 % B) et sur une colonne Ascentis Express C18 (2,7 μ m, 100 Å, 4,6 cm x 10 mm, débit : 1,2 mL / min, gradient de 0 à 10 min / 0 à 100% B). Les solvants d'élutions sont les suivants : A = H₂O / CH₃CN / AF : 90 % / 10 % / 0,1 % et B = CH₃CN / H₂O / AF : 90 % / 10 % / 0,1 %. La longueur d'onde utilisée pour la détection en UV des produits est 230 nm ou 280 nm. L'analyse en radioactivité est effectuée sur un détecteur Berthold (LB507A et LB5035).

I. 1. b) ESI

Les composés synthétisés ont été analysés par spectrométrie de masse avec une source ESI (Electrospray) couplée à un piège à ions Esquire-HCT (Bruker Daltonics). Les paramètres d'ionisation ont été configurés comme suit : potentiel d'électrospray : 4000 V ; voltage skimmer : 40 V ; sortie de capillaire : 226 V ; et température de source de 365 °C.

I. 1. c) MALDI-TOF

Les protéines et les composés ont été analysés par spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption – Time of Flight), série 4800 proposé par Applied Biosystems/MDS SCIEX. Cet appareil permet la mesure de la masse de molécules de 200 Da à 500 000 Da avec une sensibilité inférieure à une nanomole.

L'analyse d'un échantillon en MALDI se déroule en trois temps. Le mélange échantillon-matrice est ionisé par une source laser et accéléré, puis analysé dans un analyseur TOF (libre de tout champ électrique), et enfin, le rapport masse/charge (m/z) de chaque ion est mesuré sur un détecteur.

Le laser permet l'ionisation de l'échantillon. Dans l'analyseur TOF libre de tout champ électrique, chaque ion a un rapport m/z directement corrélé au temps de vol t via la relation en Équation 1. Ainsi les ions de m/z élevés arriveront plus tardivement sur le détecteur que ceux de faible m/z .

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2 \cdot z \cdot e \cdot V}}$$

où L : longueur du TOF (m), z : charge de l'ion, e : charge de l'électron ($1,602 \cdot 10^{-29}$ C), V : différence de potentiel entre la cible et la grille d'extraction (V), m : masse de l'ion (g)

Équation 1 : Relation entre le temps de vol et m/z de l'ion

La matrice utilisée est l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -HCCA).

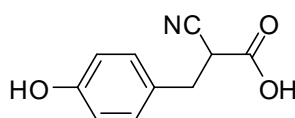


Figure 108 : Structure chimique de la matrice α -HCCA

Le mode réflectron augmente la résolution des spectres obtenus. Un système de miroirs électrostatiques permet d'allonger la distance parcourue par les ions dans le TOF tout en aidant à la refocalisation des ions de même m/z dans un même plan.

Pour les analyses MS-MS le mode PSD (Post Source Decay) a été utilisé. Les ions parents ayant accumulé trop d'énergie lors de l'ionisation vont se fragmenter en ions fils métastables pendant le vol. Les ions parents et fils arrivent en même temps en mode linéaire. En mode réflectron, grâce à la refocalisation des ions, il est possible de les séparer selon leur m/z .

En moyenne, les spectres sont le résultat de 1 000 à 2 000 shots avec une calibration interne.

I. 1. d) RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC-250Hz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Les spectres sont calibrés sur les pics de solvants résiduels (CDCl_3 : ^1H : $\delta = 7,26$) commercialisés par la société Eurisotop. La multiplicité des signaux est reportée comme suit : singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m), doublet de doublet (dd).

I. 1. e) Spectrophotomètre UV-Vis

Les mesures d'absorbances ont été effectuées sur un spectrophotomètre Beckman DU640B dans une cuve de 100 μ L après avoir effectué un blanc sur l'air.

Certaines mesures d'absorbance ont été réalisées sur le spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 avec le logiciel UV Probe2.42 dans des cuves de 100 μ L, en comparaison avec une cuve de 100 μ L contenant le solvant utilisé pour solubiliser les molécules.

I. 2. Réactifs chimiques

Les solvants et réactifs ont été utilisés sans purification supplémentaire. L' Et_2O , le cyclohexane et l' EtOH sont commercialisés par VWR. Le DMF anhydre, l' EtOAc , l'acide trifluoroacétique (TFA), le triisopropylsilane (TIS), diisopropylcarbodiimide (DIC), l'acide formique (AF) et le CH_3CN sont commercialisés par Sigma Aldrich. Le 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (ClHOBt) est fourni par Molekula. Le DMF et le CH_2Cl_2 sont fournis par Fluka. CHCl_3 a été séché sur hydrure de calcium et distillé. La résine PEGNovaTag (Novabiochem, loading : 0,33 mmol/g), les Fmoc-AA-OH et le O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) sont fournis par Novabiochem. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de silice (gel de silice 60 F254, Merck). La révélation des plaques a été réalisée sous UV (264 nm) et par de l'acide phosphomolybdique à 20 % dans l'éthanol (Sigma-Aldrich). Les chromatographies Flash ont été effectuées sur gel de silice (Si 60, 40-63mm, Merck) ou sur gel de silice inverse (100 C-18 reverse phase, Fluka).

I. 3. Synthèse du synthon phosphinique

Le schéma réactionnel de synthèse du synthon phosphinique est le suivant (Schéma 2).

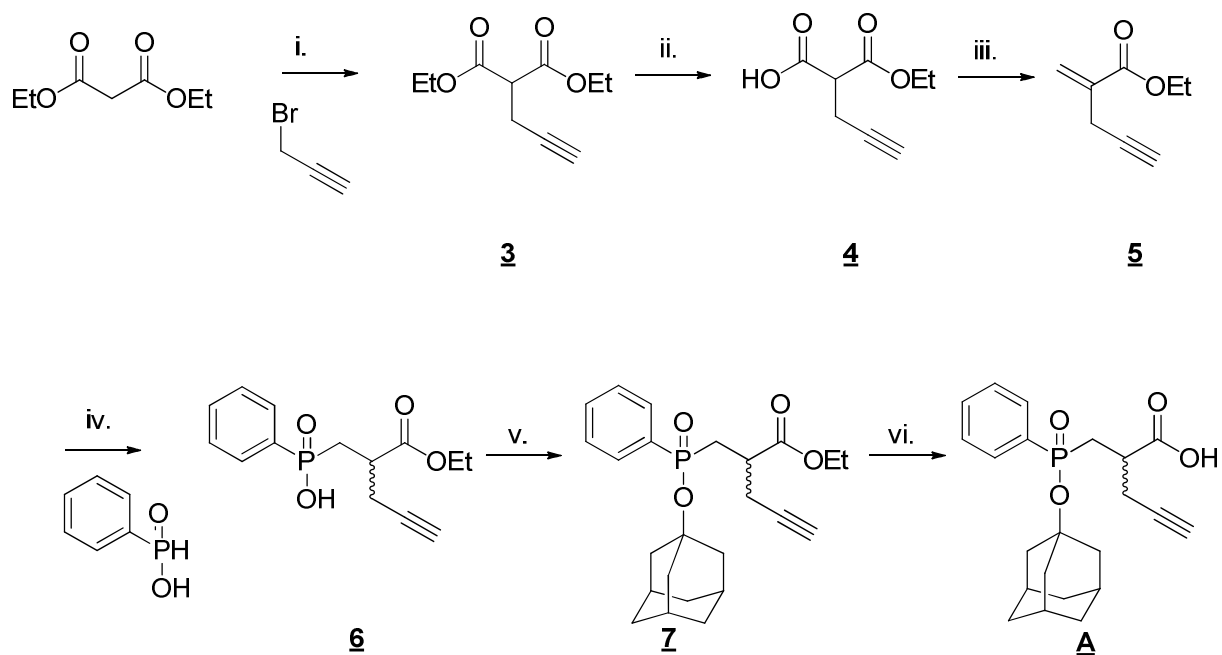
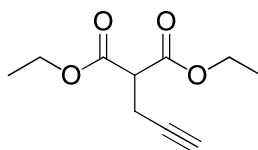


Schéma 2 : synthèse du bloc phosphinique A

Malonate de diéthyl-2-(prop-2-yn-1-yl) (3)



P.M. : 198,09 g/mol

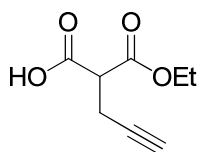
Formule brute : $C_{10}H_{14}O_4$

Le diéthylmalonate (18,2 mL, 120 mmol, 1 eq.) est chauffé à 50 °C, puis l'éthoxyde de sodium (21 % in EtOH, 40,3 mL, 108 mmol, 0,9 eq.) est ajouté. Le milieu est agité pendant 1,5 h à 50 °C. Un précipité blanc se forme. Le milieu est maintenu à 30 °C et le bromure de propargyl (80 % in toluène, 12,9 mL, 120 mmol, 1 eq.) est ajouté. Un fin précipité beige est observé. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 3 h. Le milieu est évaporé sous vide, et repris dans un mélange Et_2O/H_2O 1/1. La solution aqueuse est extraite 2 fois à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et évaporées. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie flash (Cyclohexane/EtOAc : 8/2) permettant d'obtenir 17,5 g de composés 3, soit 74 % de rendement.

Rf (cyclohexane/EtOAc : 9/1) = 0,2

1H NMR ($CDCl_3$, 250 MHz) : δ (ppm): 4,2 (q, $J = 7,2$ Hz, 4H), 3,6 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 2,78 (dd, $J = 2,5$ Hz, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,01 (t, $J = 2,5$ Hz, 1H), 1,28 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H)

Acide 2-(éthoxycarbonyl)pent-4-ynoïque (4)



P.M. : 170,06 g/mol

Formule brute : C₈H₁₀O₄

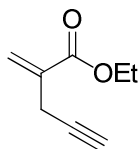
KOH (3,15 g, 56 mmol, 1,1 eq.) est dissous à 0 °C (glace/eau) dans 20 mL d'EtOH et ajouté goutte à goutte au malonate 3 (10 g, 50 mmol, 1 eq.). Le milieu est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 1 h 30. Le brut réactionnel est évaporé au rotavapor, puis repris dans EtOAc / H₂O. La phase aqueuse est acidifiée (pH 3) et extraite 3 fois à l'EtOAc, conduisant à l'obtention de 3,4 g (20 mmol) du monoacide 4, soit 40 % de rendement. Le brut est directement engagé dans l'étape suivante.

Rf (Cyclohexane/EtOAc : 9/1) = 0,3

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ (ppm) : 10,4 (s, 1H), 4,25 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,6 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 2,80 (dd, *J* = 2,5 Hz, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,05 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 1,30 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 63 MHz) : δ (ppm) : 173,4 (C), 167,8 (C), 79,6 (C), 70,9 (CH), 62,4 (CH₂), 50,9 (CH), 18,5 (CH₂), 14,1 (CH₃)

2-méthylènepent-4-ynoate d'éthyle (5)



P.M. : 138,07 g/mol

Formule brute : C₈H₁₀O₂

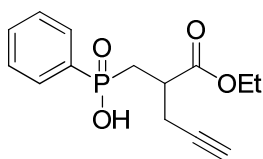
La diéthylamine (4,3 mL, 42 mmol, 2,1 eq.) est ajoutée au monoacide 4 (3,4 g, 20 mmol, 1 eq.). Le mélange réactionnel est refroidi à 0 °C (bain de glace) et le formaldéhyde 37 % (6,5 mL, 80 mmol, 4 eq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est remis à température ambiante et laissé sous agitation magnétique pendant 16 h. Le brut réactionnel est dilué avec de l'eau et extrait 3 fois à l'éther. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées au rotavapor. L'acrylate 5 obtenu (huile jaune très volatile) est utilisé directement dans l'étape suivante.

Rf (Cyclohexane/EtOAc : 9/1) = 0,6

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ (ppm) : 6,34 (d, *J* = 1 Hz, 1H), 6,03 (d, *J* = 1 Hz, 1H), 4,23 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,24 (d, *J* = 2,7 Hz, 2H), 2,2 (t, *J* = 2,7 Hz, 1H), 1,3 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 63 MHz) : δ (ppm) : 166,2 (C), 135,4 (C), 126,2 (CH₂), 80,3 (C), 72,0 (CH), 61,1 (CH₂), 21,7 (CH₂), 14,3 (CH₃)

Acide 2-(éthoxycarbonyl)pent-4-yn-1-yl)phénylphosphinique (6)



P.M. : 280,09 g/mol

Formule brute : C₁₄H₁₇O₄P

L'hexaméthylidisilazane (3,5 mL, 16,7 mmol, 1 eq.) est ajouté à l'acide phénylphosphinique (2,37 g, 16,7 mmol, 1 eq.), sous argon. Le milieu réactionnel est chauffé à 100 °C sous agitation pendant 30 min. La solution incolore est placée à 90 °C et l'acrylate 5 (20 mmol) est ajouté à contre-courant d'argon. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 90 °C pendant 20 h. Il est placé à 70 °C et « quenché » avec 6 mL d'EtOH pendant 1 h. Le brut est évaporé au rotavapor et purifié par chromatographie flash (CH₂Cl₂/AcOH/MeOH : 100/3/3), permettant l'obtention de 2,25 g (8 mmol) du bloc phosphinique 6, soit 48 % de rendement.

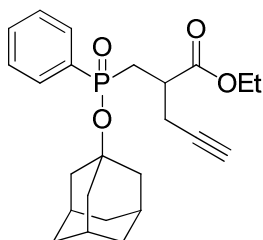
Rf (CH₂Cl₂/AcOH/MeOH : 7/0,5/0,5) = 0,8

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ (ppm) : 7,74 (m, 2H), 7,46 (m, 3H), 4,03 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,93 (s, 1H), 2,53 (m, 2H), 2,2 (td, J = 7,1, J = 13,7 Hz, 1H), 2,10 (m, 1H), 1,93 (s, 1H), 1,3 (t, J = 7,2 Hz, 3H)

³¹P NMR (CDCl₃, 101 MHz) : δ (ppm) : 40,81

ESI MH⁺ calculé : 280,1, trouvé : 280,9

(((3S,5S,7S)-adamantan-1-yloxy)phénylphosphoryl)méthyl)pent-4-ynoate d'éthyle (7)



P.M. : 414,20 g/mol

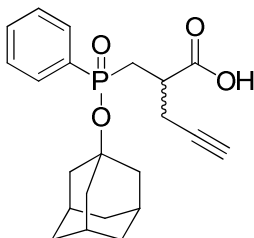
Formule brute : C₂₄H₃₁O₄P

Sous argon, l'acide phosphinique 6 (300 mg, 1,07 mmol, 1 eq.) et le 1-bromoadamantane (690 mg, 3,2 mmol, 3 eq.) sont dissous dans 20 mL de CHCl₃. Le milieu est chauffé à 60 °C. Ag₂O (744 mg, 3,2 mmol, 3 eq.) est ajouté par portion de 250 mg pendant 30 min puis le mélange réactionnel est laissé 18 h à 90 °C. Le milieu réactionnel est évaporé au rotavapor. Il est filtré sur Célite ; la Célite est lavée plusieurs fois au DCM. Le brut est purifié par chromatographie flash (CH₂Cl₂/AcOH/MeOH : 7/0,1/0,1) permettant l'obtention de 250 mg (0,6 mmol) de composé 7, soit 56 % de rendement.

Rf (CH₂Cl₂/AcOH/MeOH : 7/0,5/0,5) = 0,8

ESI MH⁺ calculé : 415,2, trouvé : 415,4

Acide 2-((((3S,5S,7S)-adamantan-1-yloxy)phénylphosphoryl)méthyl)pent-4-ynoïque (A)



P.M. : 386,16 g/mol

Formule brute : C₂₂H₂₇O₄P

L'ester (100 mg, 241 µmol, 1 eq.) est refroidi (bain de glace). LiOH.H₂O (400 mg, 964 µmol, 4 eq.) est dissous dans 1 mL de THF/H₂O 1/1, puis ajouté goutte à goutte sur l'ester. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 20 h. Le brut réactionnel est acidifié (pH 1) puis purifié par chromatographie sur silice C-18 (H₂O / CH₃CN / TFA : 90 / 10 / 0,1 jusqu'à 0 / 100 / 0,1) permettant l'obtention de 12,5 mg (31 µmol) de composé A, soit 13 % de rendement.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH : 95/5) = 0,4

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) : δ (ppm) : 7,83 (m, 2H), 7,55 (m, 3H), 2,56 (m, 5H), 2,12 (s, 4H), 2,04 (s, 6H), 1,57 (s, 6H)

ESI MH⁺ calculé : 387,2, trouvé : 387,2

ESI MH⁻ calculé : 385,2, trouvé : 385,1

HPLC analytique (Ascentis Express C18) R_t = 6,85 min

I. 4. Synthèse de la sonde radioactive

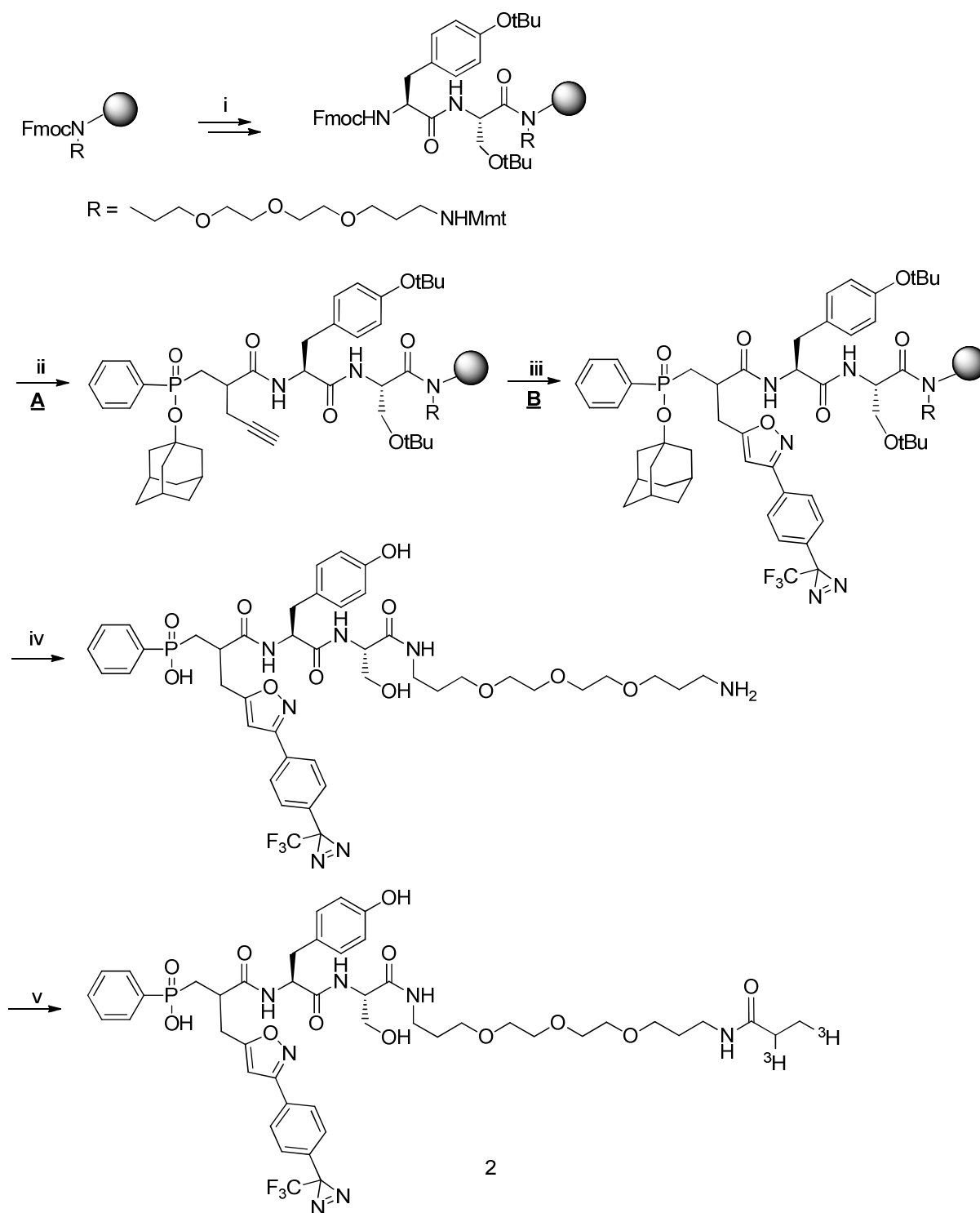
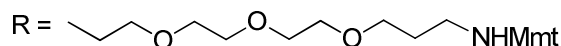
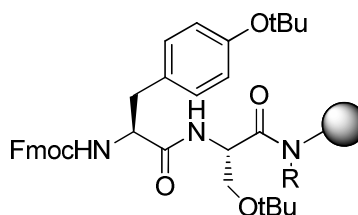


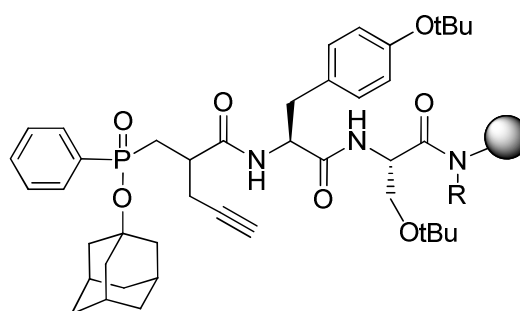
Schéma 3 : schéma de synthèse de la sonde 2 ; i- piperidine/DMF 20/80. puis Fmoc-AA-OH (10 eq.), HATU (9,4 eq.), DIEA (20 eq.), DMF, TA, 30 min ii - ClHOt (1 eq.), A (1,3 eq.), DIC (1 eq.), DMF, TA 15h iii - pyridine (1,8 eq.), B (18 eq.) CH_2Cl_2 , N-chlorosuccinimide (20 eq.), 40 °C, 4 h puis addition sur la résine, triéthylamine (14 eq.) TA, 15h, CH_2Cl_2 iv - TFA/TIS/ H_2O 95/2.5/2.5, TA, 1 h 30 v - N-succinimidyl(^3H) propionate radioactif (6,7 eq.), N-succinimidylpropionate (0,9 eq.), DIEA (5,5 eq.), DMF, TA, 40 h

Couplage d'acides aminés



1g (330 μ mol, 1 eq.) de résine Universal PEG NovaTag (Novabiochem, loading : 0,33 mmol / g) est gonflée dans 10 mL de DMF. Le groupement Fmoc est déprotégé avec une solution de pipéridine/DMF (1/4) pendant 3 min et deux fois 7 min avec une solution fraîche. La résine est rincée successivement avec du DMF, du CH_2Cl_2 et du DMF. Un mélange de 1,18 g (3,1 mmol, 9,4 eq.) de HATU et 1,26 g (3,3 mmol, 10 eq.) de Fmoc-Ser(tBu)-OH est dissous dans 10,9 mL de DMF et 1,1 mL de DIEA (6,6 mmol, 20 eq.) et agité pendant 5 min, avant d'être ajouté sur la résine. La résine est laissée dans ce milieu pendant 30 min à température ambiante sous agitation mécanique. Le couplage est réitéré avec 615 mg (1,6 mmol, 4,9 eq.) de HATU, 632 mg (1,65 mmol, 5 eq.) de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 10,9 mL de DMF et 560 μ L de DIEA (3,3 mmol, 10 eq.). Après le second couplage, la résine est rincée. Pour le couplage du second acide aminé, le protocole précédent est réitéré (déprotection du groupement Fmoc, rinçage, premier couplage, second couplage et rinçage) en utilisant 1,5 g (3,3 mmol, 10 eq.) de Fmoc-Tyr(tBu)-OH pour le premier couplage et 758 mg (1,65 mmol, 5 eq.) pour le second couplage. La résine est ensuite rincée avec du DMF et du CH_2Cl_2 , séchée et placée sous argon et à - 20 °C.

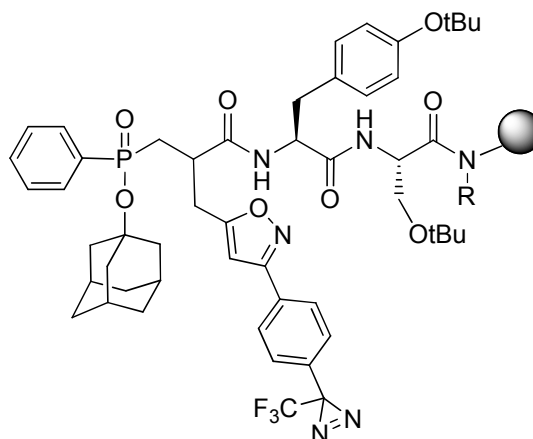
Couplage du synthon phosphinique A



42 mg (10 μ mol, 1 eq.) de résine est gonflé dans du DMF pendant 30 min, puis le groupement Fmoc est déprotégé avec une solution de pipéridine/DMF (1/4) pendant 3 min et deux fois 7 min avec une solution fraîche. La résine est rincée successivement avec du DMF, du CH_2Cl_2 et du DMF. 5,3 mg de bloc phosphinique A (13,7 μ mol, 1,3 eq.), 1,7 mg de ClHOBt (10 μ mol, 1 eq.), 500 μ L de DMF et 1,6 μ L de DIC (10 μ mol, 1 eq.) sont agités dans un réacteur de 1 mL pendant 5 min. La résine est laissée dans ce milieu pendant une nuit sous

agitation mécanique à température ambiante. Après couplage, la résine est rincée. Afin d'améliorer la séparation du produit final et des produits secondaires, les amines libres présentes sur la résine placées en présence de 1-acétylimidazole. La résine est placée dans 18 mg d'1-acétylimidazole (163 μmol , 16 eq.) préalablement dissous dans 500 μL de DMF, pendant 30 min sous agitation mécanique, à température ambiante. La résine est rincée, séchée et placée sous argon à - 20 °C.

Cycloaddition 1,3 dipolaire sur support solide

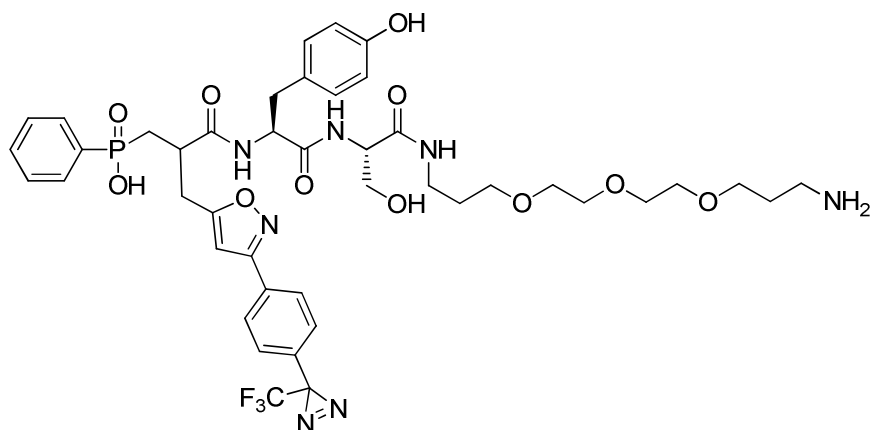


Toutes les étapes suivantes sont réalisées à l'abri de la lumière afin d'éviter l'activation de la trifluométhylphényldiazirine.

L'oxime B (42 mg, 183 μmol , 18 eq.) est placée dans un ballon de 5 mL, à l'abri de la lumière et sous argon. 1 mL de CH_2Cl_2 et 1,5 μL de pyridine (18 μmol , 1,8 eq.) sont ajoutés. Le milieu est chauffé au reflux du CH_2Cl_2 (40 °C). Le N-chlorosuccinimide (27 mg, 202 μmol , 20 eq.) est ajouté par portions égales de 9 mg pendant 15 min. Afin d'assurer l'étanchéité du montage, du téflon est enroulé autour de la connexion entre le ballon et le réfrigérant. Le milieu est chauffé à 40 °C pendant 4 h et suivi par CCM (Cyclohexane/EtOAc : 8/2, R_f = 0,8). Le milieu est évaporé au rotavapor, puis repris dans $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$. La phase organique est lavée deux fois à l'eau, puis elle est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée au rotavapor, pour obtenir une huile jaune directement engagée dans la cycloaddition 1,3-dipolaire.

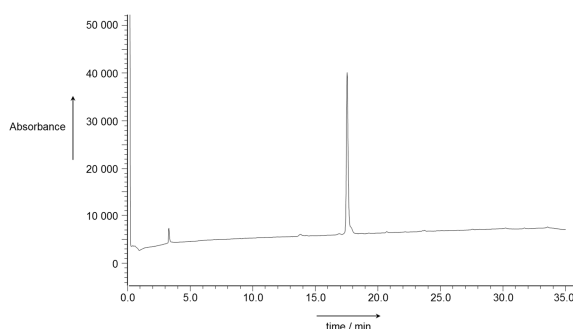
La résine précédente est gonflée et rincée. La chloroxime (183 μmol , 18 eq.) est reprise dans 250 μL de DCM et ajoutée sur la résine. 20 μL de triéthylamine (143 μmol , 14 eq.) sont ajoutés dans ce milieu. La résine est laissée 15 h sous agitation mécanique à température ambiante, à l'abri de la lumière. La solution est orange en fin de réaction. La résine est rincée.

Clivage du support solide: précurseur de la sonde radioactive

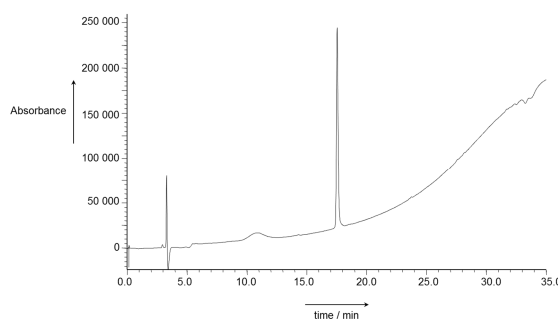


La résine est clivée. Les solutions de clivage sont diluées par 10 dans de l'eau distillée, et immédiatement lyophilisées. Elles sont purifiées par HPLC à 230 nm. Chaque pic correspondant au produit souhaité est immédiatement lyophilisé et placé à l'abri de la lumière afin d'éviter toute dégradation de la diazirine.

Deux diastéréoisomères sont séparés par HPLC : diastéréoisomère 1, élué dans la 1^{ère} fraction (547 nmol) et diastéréoisomère 2, élué dans la 2^{ème} fraction (508 nmol), soit 10,5 % de rendement.



**Figure 109 : HPLC analytique du diastéréoisomère 1 (Hypersil C-18, λ = 280 nm, 0 - 100 % B entre 0 et 30 min)
 R_t = 17,5 min**



**Figure 110 : HPLC analytique du diastéréoisomère 1 (Hypersil C-18, λ = 230 nm, 0 - 100 % B entre 0 et 30 min)
 R_t = 17,5 min**

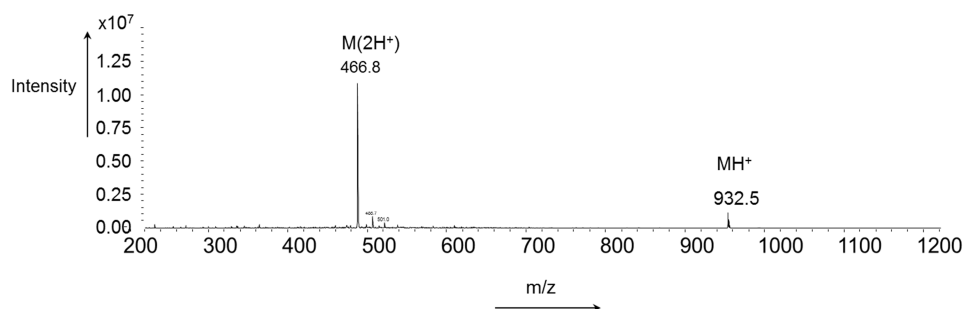


Figure 111 : ESI mode positif du diastéréoisomère 1 MH^+ calculé : 932,35, trouvé : 932,5

Sous irradiation du laser du MALDI, la diazirine est capable de se convertir partiellement en carbène correspondant, ce qui conduit à l'observation d'un ion $[M-N_2+H]^+$, possédant un m/z réduit de 28,01 (perte de N_2) par rapport au m/z attendu.

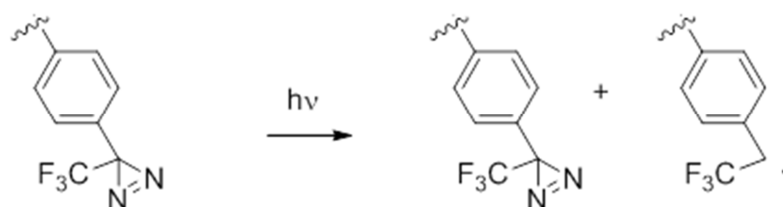


schéma 4 : photo-irradiation de la diazirine conduisant à la formation d'un carbène

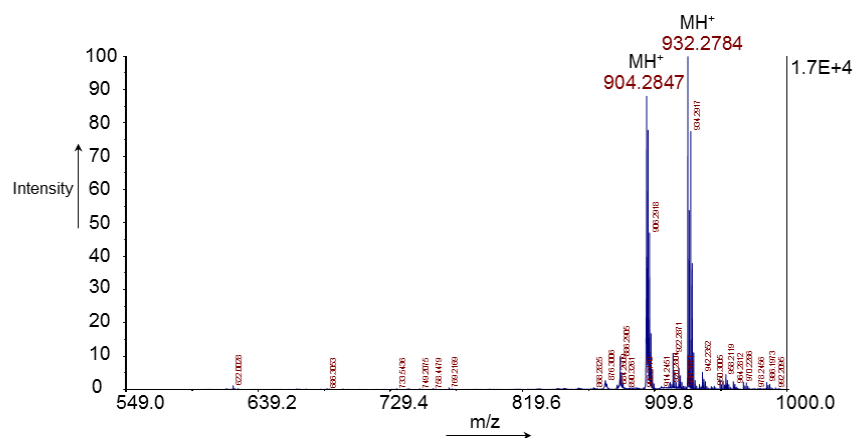
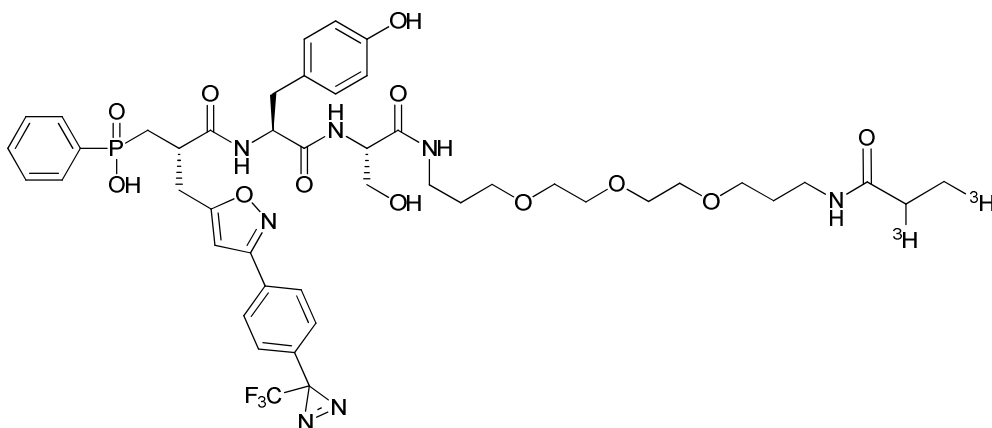


Figure 112 : MALDI en mode positif MH^+ calculé : 932,35, trouvé : 932,28 et $[M-N_2+H]^+$ calculé : 904,34, trouvé: 904,29

Propionylation radioactive conduisant à la sonde 2 (diastéréoisomère 1)



Le N-succinimidyl(^3H) propionate radioactif, conservé dans du MeOH, est évaporé au SpeedVac. Le N-succinimidyl(^3H) propionate radioactif (292 nmol, 6,7 eq.) est repris dans 60 μL de DMF et ajouté sur le précurseur précédemment synthétisé (43 nmol, 1 eq.). 1,7 μL d'une solution à 22,7 mM de N-succinimidyl propionate (39 nmol, 0,9 eq.), fraîchement préparée dans le DMF, 4,1 μL d'une solution à 58,4 mM de DIEA (240 nmol, 5,5 eq.) et 134 μL de DMF sont ajoutés. Le milieu est laissé sous agitation magnétique pendant 40 h. Le brut réactionnel est purifié par RP-HPLC.

10,4 nmol de diastéréoisomère élué dans la 1^{ère} fraction (diastéréoisomère 1) sont obtenues après purification et repris dans 600 μL d'EtOH/H₂O (80/20), soit 24% de rendement. La radioactivité de 1 μL de solution a été mesurée en triplicate pour donner une activité totale de 526 μCi , soit une activité spécifique de ce composé de 50,7 Ci/mmol.

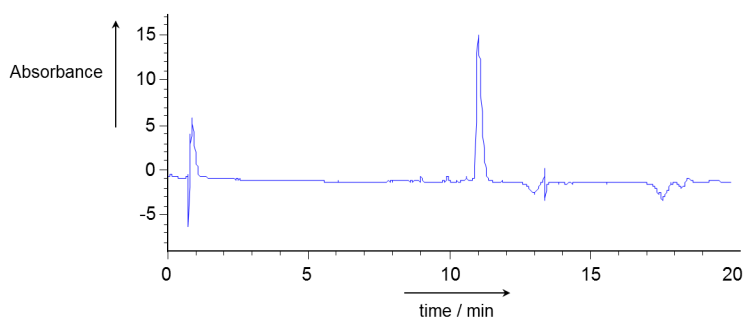


Figure 113 : HPLC Analytique Ascentis Express C18 (10 cm x 4,6 mm; 2,7 μm , gradient : 0 à 12 min / 0 à 100 % B, débit 1,2 ml/min) UV à $\lambda = 275 \text{ nm}$. Rt = 11,0 min

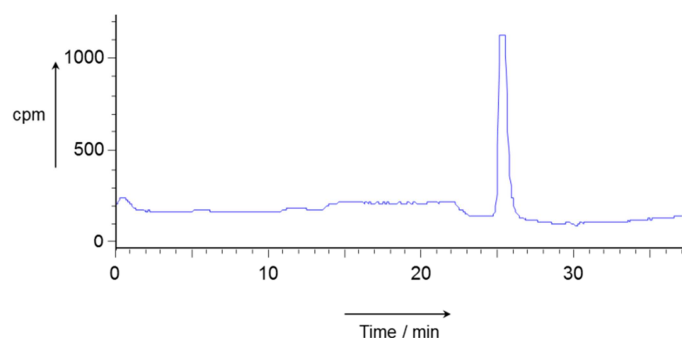


Figure 114 : HPLC analytique radioactive Waters Atlantis C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm, gradient : 0 à 30 min / 0 à 100 % B, débit 1,0 mL/min) Profil de radioactivité. R_t = 25,4 min

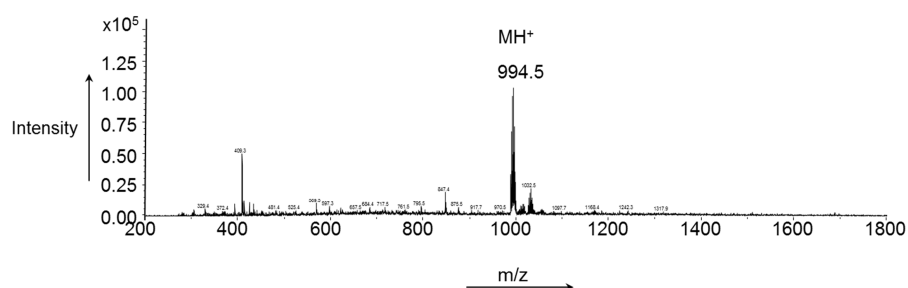


Figure 115 : ESI mode positif : MH⁺ calculé : 988,4, trouvé : 988,5

Le groupement diazirine a la même instabilité observée avec le précurseur précédent, conduisant à l'observation du carbène correspondant à la sonde sous irradiation du laser du MALDI-TOF, dont le m/z est réduit de 28,01.

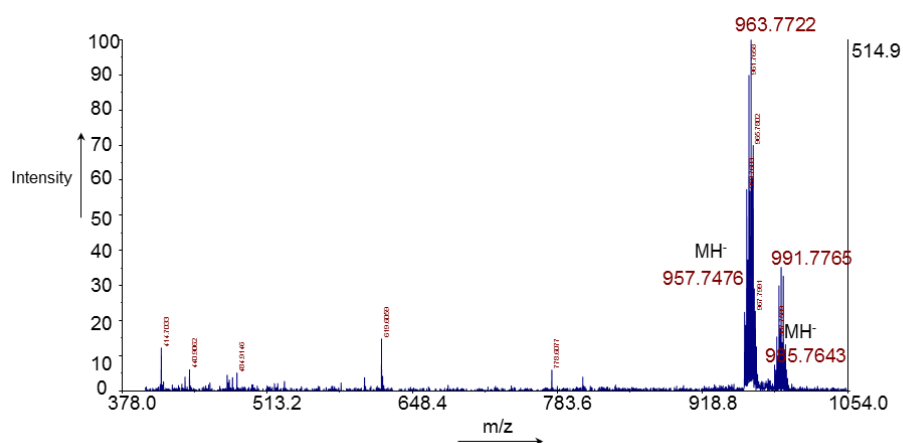
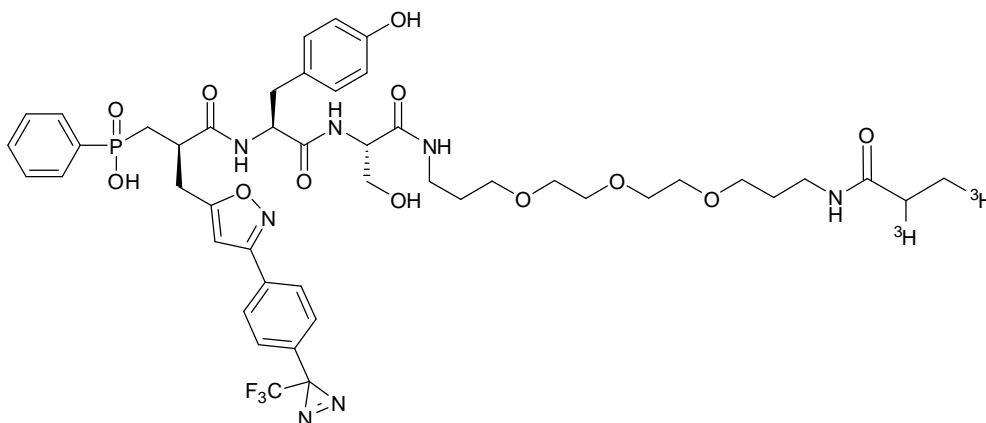


Figure 116 : MALDI: MH^- calculé : 986,4, trouvé : 985,7; $[M-N_2-H^+]^-$ calculé 957,7, trouvé : 958,0

Propionylation radioactive conduisant au diastéréoisomère 2



Suite à un protocole identique de marquage avec le N-succinimidyl(^3H) propionate radioactif, 11,8 nmol du diastéréoisomère élué dans la deuxième fraction (diastéréoisomère 2) sont obtenues après purification et sont repris dans 950 μL d'EtOH/H₂O (80/20), soit 28 % de rendement sur cette étape. La radioactivité de 1 μL de solution a été mesurée en triplicate pour donner une activité totale de 739 μCi dans l'échantillon, soit une activité spécifique de ce composé de 62,6 Ci/mmol.

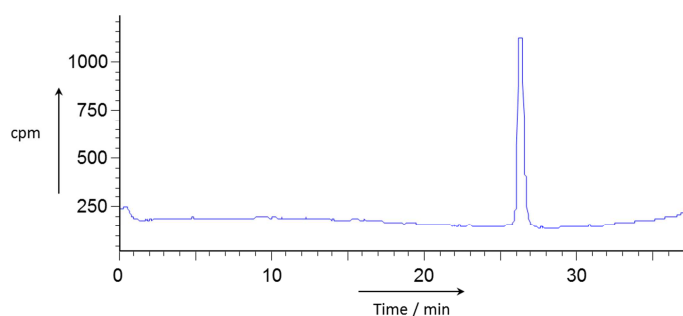


Figure 117 : HPLC analytique radioactive du diastéréoisomère 2 (4,6 x 250 mm, 5 μm , gradient : 0 à 30 min / 0 à 100 % B, débit 1,0 mL/min) Profil de radioactivité. R_t = 26,5 min

Le diastéréoisomère élué dans la première fraction HPLC présente l'affinité la plus élevée pour les MMP. Par analogie avec des travaux précédents sur ce type de composés,¹⁹⁰ le carbone α du résidu en position P_1' dans ce diastéréoisomère est considéré comme ayant la configuration S. L'ensemble des expériences suivantes ont été réalisées avec le diastéréoisomère 1.

II. Matériels et méthodes biochimie

II. 1. Matériels et méthodes d'analyse en biochimie

II. 1. a) Dosage de Bradford

La quantité totale de protéine contenue dans un échantillon de milieu complexe est estimée en utilisant le principe du dosage de Bradford. Il est possible de détecter 0,2 à 20 µg de protéines via cette méthode. Le dosage colorimétrique de Bradford utilise le changement d'absorbance du Bleu de Coomassie G-250® lorsqu'il est complexé avec des résidus aromatiques ou hydrophobes d'une protéine. Le maximum d'absorbance de la forme libre du colorant (forme cationique) est à 465 nm alors que le maximum d'absorbance de la forme liée aux protéines (forme anionique) est à 595 nm. La mesure de la variation d'absorbance à 595 nm est directement proportionnelle à la quantité de protéine fixée sur le colorant.

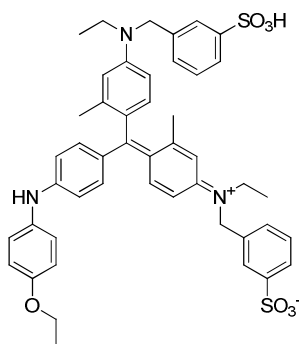


Figure 118 : structure du colorant Bleu de Coomassie G-250 utilisé pour le dosage de Bradford

La solution de Bleu de Coomassie G-250 (Biorad ref 500-0006) est diluée à 1/5^{ème} dans de l'eau distillée et 1 mL de cette solution est réparti dans des cuves adaptables au spectromètre. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec de la Bovine Serum Albumin (BSA) : 0 µg ; 2,5 µg ; 5 µg ; 7,5 µg ; 10 µg. Un volume de 1 à 10 µL d'échantillon est ajouté à une cuve contenant 1 mL de solution de Bradford. Les mesures des milieux complexes sont effectuées en duplicate. Après 10 min dans le noir, l'absorbance à 595 nm est mesurée. Les mesures effectuées sur le milieu complexe sont évaluées par rapport à la gamme de BSA.

II. 1. b) Radioimageur (β-imager)

Le β-imager 2000 (société Biospace) est utilisé pour analyser la localisation et la quantité de radioactivité présente sur les membranes PVDF. La membrane est placée sur une plaque de verre directement dans la chambre d'ionisation. Les rayonnements β⁻ du tritium ionisent le gaz scintillant (mélange d'argon et de triéthylamine) pour former des électrons d'ionisation primaires. Sous l'action d'un champ électrique puissant (5,3 kW/cm),

ces électrons sont accélérés et ionisent le gaz, créant une avalanche d'électron. Ces avalanches d'électrons génèrent des photons, détectés par une caméra CCD intensifiée qui analyse la lumière émise sous forme de taches lumineuses. Un traitement mathématique via un logiciel permet d'établir une image présentant la localisation et l'intensité de la radioactivité présente initialement sur l'échantillon (Figure 119).

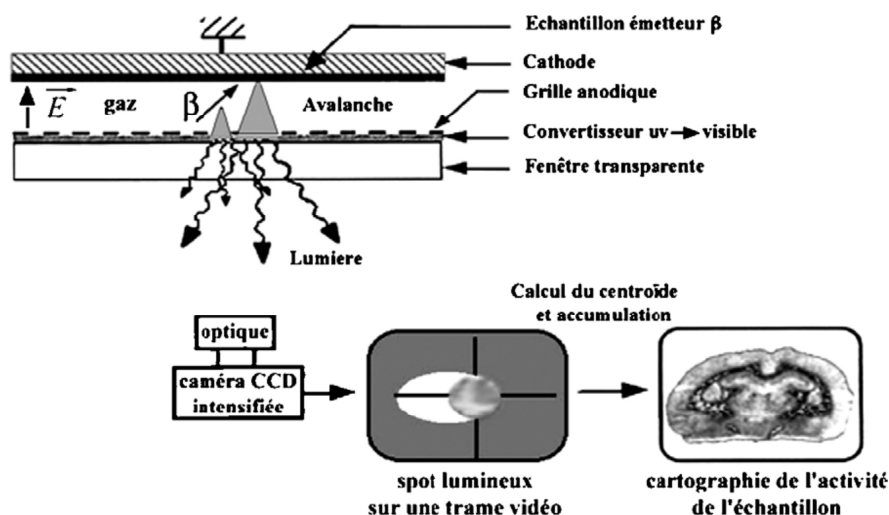


Figure 119 : schéma de fonctionnement d'un βimager¹⁹⁸

Ce type d'appareil permet une grande sensibilité de radioactivité détectable (environ 1 pCi) et une grande sensibilité spatiale (50 μm pour le tritium). Cependant, son rendement de comptage est limité à 50 % (seules les particules émettant dans la direction de la caméra CCD peuvent être comptées) et par l'épaisseur de l'échantillon : la radioactivité observée ne correspond qu'à la radioactivité présente dans une couche de l'échantillon de 0,54 μm environ.

II. 1. c) Fluorimètre

Le signal de fluorescence est analysé par un fluorimètre (spectrophotomètre à compteur de photon, Fluoroskan Ascent, Thermolab Systems) équipé d'un thermostat et d'un système d'agitation.

II. 2. Enzymes, substrats et tests d'activité enzymatique

II. 2. a) Enzymes

Les domaines catalytiques des enzymes (hMMP-2, hMMP-8, hMMP-13, hMMP-14) sont commercialisés par la société CIRMMP (anciennement Protera). Les domaines catalytiques hMMP-9, hMMP-12 (mutant F67D) et mMMP-12 ont été produits par voie recombinante dans E.Coli au laboratoire. Les enzymes (hMMP-2, hMMP-3, hMMP-8, hMMP-9, hMMP-12, hMMP-13, hMMP-14) sous forme entière proviennent de R&D System. Sauf

indication contraire, les dilutions des solutions d'enzyme sont préparées dans du tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,01 % brij-35, pH 6,8, filtrée au travers de filtres de taille 0,22 µm avant l'ajout de brij-35.

II. 2. b) Substrats

Les substrats Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (Mca-Mat) et Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys(Dnp)-NH₂ (McaMMP-3) sont commercialisés à façon par Enzo Life Science.

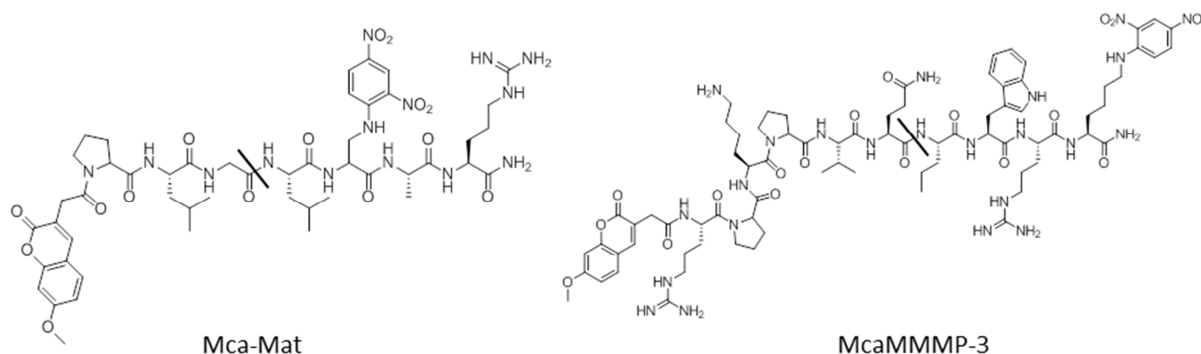


Figure 120 : structure chimique des substrats Mca-Mat et McaMMP-3

Les séquences peptidiques des substrats sont clivées par les enzymes respectivement entre la glycine et la leucine pour le Mca-Mat et la glutamine et la norvaline pour le McaMMP-3. Sauf indication contraire, les dilutions de solution de substrat sont préparées dans le DMSO.

II. 2. c) Tests d'activité enzymatique

Les tests enzymatiques ont été effectués dans des plaques 96 puits (plaques noires NBS 3650, Corning Costar, France). Un substrat peptidique fonctionnalisé par un groupement quencheur et un groupement émetteur de fluorescence est utilisé dans les tests enzymatiques. A l'état initial, le groupement quencheur empêche l'émission de la fluorescence du groupement émetteur. Les tests consistent à mesurer l'émission de fluorescence à $\lambda_{em} = 405$ nm (pour le Mca), concomitante au clivage par l'enzyme d'une séquence peptidique fonctionnalisée initialement par un groupement émetteur ($\lambda_{ex} = 320$ nm pour le Mca) et un groupement quencheur de fluorescence. Une fois le substrat clivé, le groupement émetteur est éloigné du groupement quencheur, ce qui permet l'émission et la mesure de la fluorescence de l'émetteur par le fluorimètre (Figure 121).

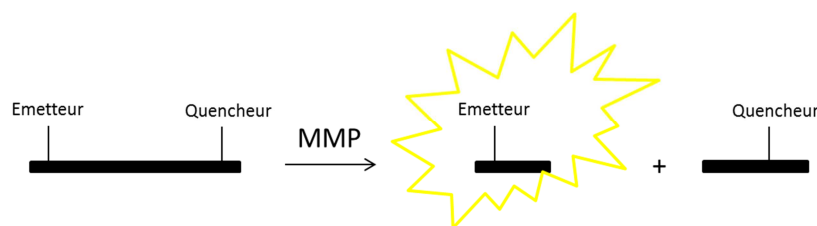


Figure 121 : Schéma du clivage du substrat fluorogénique par une MMP

L'activité enzymatique est mesurée dans des plaques 96 puits contenant environ 100 μ L, en dupliquat:

- 99 μ L de tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, pH 6,8
- 1 μ L d'une solution d'enzyme 100 fois plus concentrée que la concentration finale dans le puits pour chaque MMP, présentée en Tableau 11
- 0,5 μ L de substrat Mca-Mat à 1,8 mM (concentration finale de 9 μ M) ou 0,5 μ L de substrat McaMMP-3 (concentration finale de 9 μ M) pour la hMMP-3

La plaque est agitée 10 secondes sur un agitateur mécanique puis la fluorescence est mesurée pendant 30 min par le fluorimètre.

Les activités de référence à une concentration de solution d'enzyme différente selon les MMP testées sont présentées dans le Tableau 11, avec une lecture de 30 min sur le fluorimètre. Dans les tests d'activité enzymatique, les concentrations en substrat utilisées sont telles que moins de 10 % du substrat est dégradé par l'enzyme.

Tableau 11 : tableau de la concentration finale enzymatique dans un puits pour les activités enzymatiques de référence

	hMMP-2	hMMP-3	hMMP-8	hMMP-9	hMMP-12	hMMP-13	hMMP-14	mMMP-12
concentration de la solution d'enzyme (nM) finale dans le puits	0,05	3,5	0,1	0,05	1	0,1	0,1	1
ΔF usuel mesuré pour les activités de référence	14	15	13	17	8	12	8	5

II. 2. d) Activation des enzymes

Les MMP sous forme entière (société R&D) contiennent le prodomaine qui inhibe l'activité enzymatique des MMP. L'activation des MMP est réalisée chimiquement à l'aide de l'acétate de 4-Aminophénylmercure (APMA). L'APMA réagit avec la cystéine du prodomaine par une interaction du mercure avec l'atome de zinc du site actif. Cette modification entraîne un déplacement du prodomaine du site actif, permettant l'autolyse de l'enzyme par la coupure du prodomaine.

Le volume de tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, brij 0,01%, pH 6,8 est réajusté en fonction du volume initial pour obtenir une solution d'enzyme à 100 µg / mL (soit 100 µL de volume final pour 10 µg de protéines). A l'abri de la lumière, 1 µL d'APMA à 100 mM (préparé extemporanément dans le DMSO) est ajouté à la solution d'enzyme. A l'abri de la lumière, la solution d'enzyme est activée à 37°C pendant une durée dépendante de l'enzyme à activer, comme présenté dans le Tableau 12. Les solutions d'enzyme sont ensuite replacées à 4 °C et sous la lumière ambiante afin de dégrader l'excès d'APMA. Elles sont ensuite aliquotées en volumes de 10 µL et stockées à - 80 °C afin de limiter leur autolyse.

Tableau 12 : tableau des durées d'activation selon les enzymes

	hMMP-2	hMMP-3	hMMP-8	hMMP-9	hMMP-12	hMMP-13
durée d'activation	1 h	30 min	1 h 30	24 h	2 h	2 h 15

Dans le cas de la hMMP-14, la furine permet l'activation de la MMP. Pour cela, la MMP-14 est diluée à 40 µg/mL (250 µL pour 10 µg) dans du tampon 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 0,01 % brij-35, pH 6,8 en présence de 0,86 µg/mL de furine. Après 1,5 h d'incubation à 37 °C, la MMP est titrée et l'activité de la MMP-14 est mesurée.

Lors du protocole d'activation, les enzymes peuvent se dégrader. Il est nécessaire de connaître la quantité d'enzyme compétente pour l'hydrolyse d'un substrat par une expérience de titration. Le Tableau 13 reporte les concentrations théoriques des enzymes sous forme entière, leur volume initial et leur tampon de stockage.

Tableau 13 : volume et concentration théorique des MMP sous forme entière

	hMMP-2	hMMP-3	hMMP-8	hMMP-9	hMMP-12	hMMP-13	hMMP-14
Volume initial	27,1 µL	21,8 µL	-	50 µL	48,1 µL	50 µL	20,5 µL
Tampon de stockage	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,05% brij-35, pH 7,4	12,5 mM Tris, 5 mM CaCl ₂ , 100 mM NaCl, 50% glycerol 0,025% brij-35 pH 8,0	-	50 mM Tris 150 mM NaCl, 10 mM CaCl ₂ , 0,05% brij-35	15 mM MES, 320 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , pH 5,5	25 mM MES, 150 mM NaCl, 10mM CaCl ₂ , 0,05% brij-35 pH 6,0	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl ₂ , 1µM ZnCl ₂ , 50% glycérol pH 8,5
Poids moléculaire après activation	71 kDa	54–56 kDa	51 kDa	77 kDa	52 kDa	52 kDa	31 kDa
Concentration théorique pour 10 µg	1,41 µM	1,92 µM	1,96 µM	1,30 µM	0,96 µM	1,92 µM	3,23 µM

II. 2. e) Titration des solutions d'enzyme

Les enzymes sont dosées par des inhibiteurs puissants des MMP pour connaître la quantité réelle de forme active apte à l'hydrolyse des substrats. Pour les enzymes produites au laboratoire, la mesure de l'absorbance à 280 nm donne accès à la concentration totale de la solution d'enzyme. Les coefficients d'extinction molaires utilisés pour les mMMP-12, hMMP-9 et hMMP-12 sont présentés en Tableau 14. Pour les enzymes sous forme entière, le Tableau 13 présente les concentrations théoriques de chaque enzyme, pour une concentration de 100 µg / mL.

Tableau 14 : coefficients d'extinction molaire et poids moléculaire des hMMP-9, hMMP-12 et mMMP-12 produites au laboratoire

	hMMP-9	hMMP-12	mMMP-12
Coefficient d'extinction molaire ϵ (mol⁻¹.cm⁻¹)	33 920	26 930	32 890
Poids moléculaire	18 317	17 592,6	18 572,9

Les expériences de titration sont réalisées avec les inhibiteurs LD500.1 et LD437 (Figure 122, inhibiteurs synthétisés au laboratoire) dont les affinités sont présentées en Tableau 15.

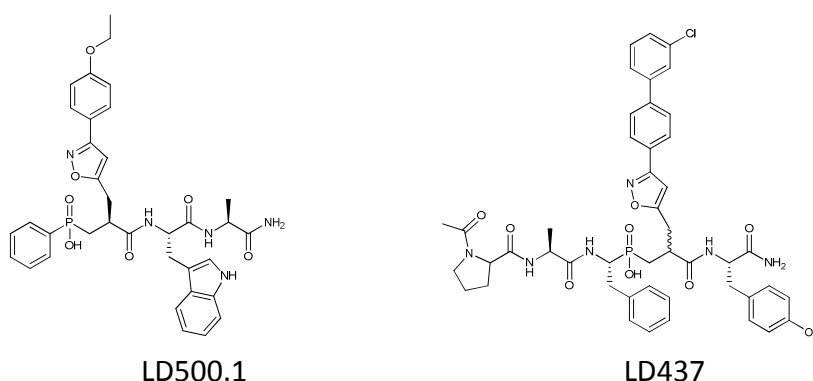


Figure 122 : Structure chimique des inhibiteurs LD 500.1 et LD 437 utilisés pour la titration des solutions d'enzyme

Tableau 15 : tableau des constantes d'inhibition de l'inhibiteur LD500.1 utilisé pour la titration des solutions d'enzyme

	hMMP-2	hMMP-3	hMMP-8	hMMP-9	hMMP-12	hMMP-13	hMMP-14	mMMP-12
Ki inhibiteur LD500.1 (nM) incubation 16 h	0,009	2,6	0,09	0,004	0,019	0,027	0,54	1
Ki inhibiteur LD437 (nM) incubation 3 h	-	1,33	-	-	-	-	-	-

Pour titrer les solutions d'enzyme, dans un volume d'environ 100 μ L, les conditions expérimentales suivantes sont mises en place en duplicate (14 puits au total) :

- 95 μ L de Tampon Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 6,8
- 5 μ L de solution d'enzyme à 200 nM (concentration finale de 10 nM dans le puits)
- 0 nM / 1 nM / 2,5 nM / 5 nM / 7 nM / 10 nM / 20 nM d'inhibiteur LD500.1 final dans un puits, soit respectivement des volumes de 0 μ L / 1 μ L / 2,5 μ L de solution d'inhibiteur à 0,1 μ M puis 0,5 μ L / 0,7 μ L / 1 μ L / 2 μ L de solution d'inhibiteur à 1 μ M.

Après 45 min d'incubation à température ambiante sous agitation mécanique, 1 μ L de McaMMP-3 à 1,8 mM (concentration finale de 18 μ M dans le puits) sont ajoutés dans les 14 puits ; la plaque est agitée sur un agitateur mécanique et la fluorescence est mesurée pendant 30 min sur le fluorimètre.

Pour la hMMP-3, la titration est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, avec l'inhibiteur LD437 à la place de l'inhibiteur LD500.1 et le substrat Mca-Mat au lieu du substrat Mca-MMP-3.

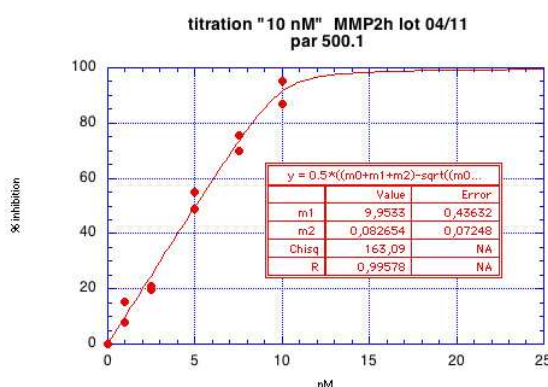


Figure 123 : exemple de la titration de la hMMP-2 par l'inhibiteur LD500.1

Le pourcentage d'inhibition calculé par rapport à l'activité de référence sans inhibiteur, est déterminé pour chaque concentration d'inhibiteur. Il est reporté dans un graphique présentant le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique de référence en fonction du logarithme de la concentration de la solution d'inhibiteur. Il est ainsi possible de déterminer le pourcentage d'enzyme active. Dans l'exemple de la Figure 123, la solution d'enzyme est dosée à 9,95 nM (m1) au lieu de 10 nM, ce qui correspond à une activité de 99,5 %.

II. 2. f) Détermination de la constante d'inhibition des sondes (Ki)

Les constantes d'inhibition sont déterminées en utilisant la méthode d'Horovitz et Levitzki¹⁹¹, prenant compte les concentrations d'enzyme, d'inhibiteur, de substrat, et

l'affinité de celui-ci (K_M) pour cette enzyme. Le protocole mis en place correspond aux conditions expérimentales suivantes, dans une plaque 96 puits contenant environ 100 μL :

- 99 μL de Tampon Tris 50 mM CaCl_2 10 mM pH 6,8
- 1 μL de solution d'enzyme d'une solution d'enzyme 100 fois plus concentrée que la concentration finale dans le puits pour chaque MMP, présentée en Tableau 11
- 1 nM / 3 nM / 10 nM / 30 nM / 100 nM d'inhibiteur

Après 45 min d'incubation à température ambiante et sous agitation, le substrat McaMat (concentration finale de 9 μM dans chaque puits, soit 0,5 μL à 1,8 mM) est ajouté et la fluorescence est mesurée pendant 30 min sur le fluorimètre.

Les concentrations en solution d'enzyme utilisées dans ces tests sont les suivantes : 0,05 nM (hMMP-2), 3,5 nM (hMMP-3), 0,1 nM (hMMP-8), 0,05 nM (hMMP-9), 0,2 nM (hMMP-12), 0,1 nM (hMMP-13), 0,1 nM (hMMP-14) et 0,5 nM (mMMP-12).

Pour chaque concentration d'inhibiteur, l'augmentation du signal de fluorescence en fonction du temps est linéaire et permet de calculer la pente de la fluorescence en fonction temps. Pour chaque concentration d'inhibiteur, le rapport des pentes par rapport à la pente de la référence (sans inhibiteur) donne accès au pourcentage d'inhibition. L'analyse du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en inhibiteur est une sigmoïde, permettant de calculer le K_i .

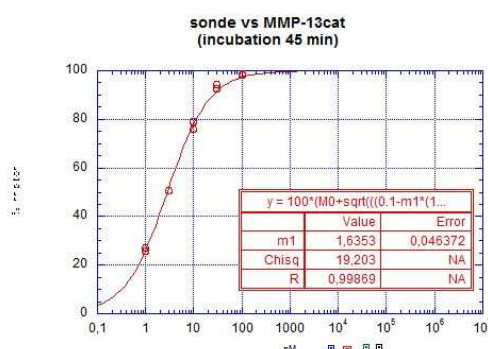


Figure 124 : exemple de la détermination du K_i de la sonde radioactive vis-à-vis de la hMMP-13

Dans l'exemple présenté en Figure 124, la représentation graphique du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en inhibiteur est une sigmoïde qui donne accès au K_i : 1,6 nM (m_1) vis-à-vis de la hMMP-13.

II. 3. Dispositif de photo-irradiation

Les expériences de photo-irradiation des complexes enzyme-sonde sont réalisées sur un banc optique, en chambre noire, sous lumière inactinique à vapeur de sodium. Le dispositif de photo-irradiation, schématisé en Figure 125, est composé d'une lampe à mercure (1000 W, Orsam, ref HBO 1002W/CEL), d'une ouverture et d'une série de lentilles focalisant la lumière polychromatique vers un monochromateur (Jobin-Yvon), derrière lequel

une autre série de lentille focalise la lumière monochromatique sur un porte-échantillon, refroidi à 10 °C par un cryostat. L'intensité du faisceau de lumière (dimension 24 mm²) est mesurée par un radiomètre IL 700 (International Light, Newburyport, MA). La variation de la dimension de l'ouverture permet de moduler l'intensité du faisceau monochromatique sur l'échantillon.

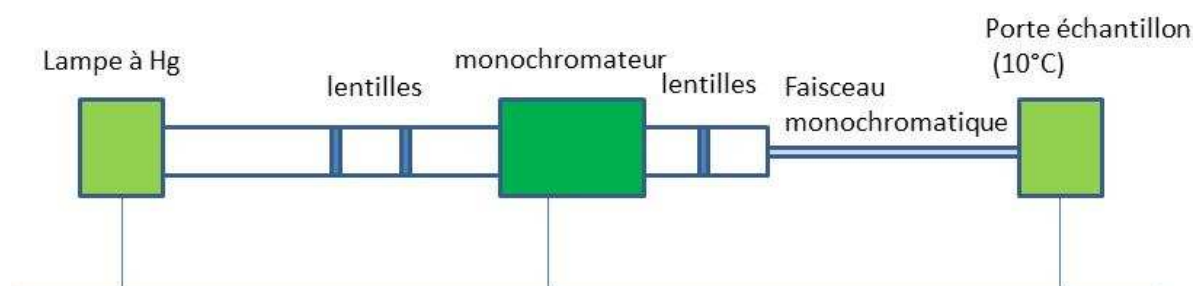


Figure 125 : Schéma du dispositif de photo-irradiation

Les tubes eppendorf de 500 µL, sont posés sur le porte-échantillon réfrigéré à 10°C. Le banc optique est réglé sur une longueur d'onde de 353 nm et l'échantillon est photo-irradié pendant 10 min à une puissance de 30 mW / cm². Après photo-irradiation de l'échantillon, du tampon de Laemmli 5X (Tris 250 mM, SDS 10 %, β-mercapto-éthanol 10 %, Glycérol 60 %, 0,25 % bleu de bromophénol, pH 6,8) est ajouté dans l'échantillon.

II. 4. Préparation et photoirradiation des échantillons

La photoirradiation des échantillons a été réalisée en tubes eppendorf de 500 µL. Après ajout de la sonde **2**, les milieux (tampon ou milieux complexes) ont été incubés pendant 45 min à l'abri de la lumière avant photoirradiation.

Pour les expériences réalisées en tampon, à haute concentration d'enzyme, 50 µL de MMP (250 nM) ont été préparées dans du tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, brij-35 0,01 % et incubées de sonde **2** (100 nM). Les échantillons ont été photoirradiés (ou non photoirradiés) puis 12,5 µL de tampon de Laemmli 5 X (Tris 250 mM, SDS 10 %, β-mercapto-éthanol 10 %, glycérol 60 %, 0,25 % bleu de bromophénol, pH 6,8) ont été immédiatement ajoutés. Pour les expériences de compétition, l'enzyme (250 nM) a été préincubée en présence de compétiteur (RXP470.1 ou LD500.1, 10 µM) pendant 45 min, puis la sonde **2** (100 nM) a été incubée 45 min avant photoirradiation des échantillons, puis ajout de 12,5 µL de tampon de Laemmli 5X. Pour les expériences de sensibilité de détection, des concentrations variables en enzymes (concentrations finales de 0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM ou 1 nM pour la mMMP-12, de 0,2 nM, 1 nM, 2 nM ou 5 nM pour la hMMP-12, de 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM ou 2 nM pour la hMMP-9, 50 µL) ont été incubées en

tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, brij-35 0,01 %, pH6,8 en présence de sonde **2** (100 nM) avant photoirradiation puis ajout 12,5 μL de tampon de Laemmli 5 X.

Pour les expériences avec les milieux complexes, la sonde **2** (100 nM) a été incubée dans 50 μL de milieu pendant 45 min sur glace à l'abri de la lumière avant photoirradiation puis ajout de 12,5 μL de tampon de Laemmli 5 X. Pour les expériences de compétition, le RXP470.1 (10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM) a été incubé dans 50 μL de milieu complexe pendant 45 min, puis la sonde **2** (100 nM) a été incubée pendant 45 min à l'abri de la lumière avant photoirradiation, puis l'ajout de 12,5 μL de tampon de Laemmli 5X. Pour les expériences en présence de mMMP-12 recombinante, à 50 μL de milieu complexe ont été ajoutées la MMP-12 (1 nM de mMMP-12 pour les BAL et 5 nM de hMMP-12 pour les carotides et aortes, respectivement), puis la sonde **2** (100 nM) a été incubée pendant 45 min à l'abri de la lumière avant photoirradiation, puis 12,5 μL de tampon de Laemmli 5X ont été ajoutés. Pour les expériences de compétition en présence de MMP-12 recombinante, ont été ajoutés (dans l'ordre) : 50 μL de milieu, la MMP-12, le RXP470.1 (10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM) et incubés pendant 45 min sur glace. Puis, la sonde **2** (100 nM) a été incubée pendant 45 min avant photoirradiation et ajout de 12,5 μL de tampon de Laemmli 5X. Pour les expériences en présence d' α -macroglobuline, ont été ajoutées (dans l'ordre) : 50 μL de BAL, la MMP-12 (10 nM), l' α -macroglobuline (760 nM). Après 45 min d'incubation, ont été ajoutés soit la sonde **2** (100 nM), soit le RXP470.1 (10 μM) et incubés pendant 45 min sur glace. Dans l'échantillon contenant le RXP470.1, la sonde **2** a été ajoutée et incubée pendant 45 min avant photoirradiation.

II. 5. Gels d'électrophorèse SDS-PAGE

Plusieurs types de gels sont utilisés : les gels Tris-Glycine-HCl SDS-PAGE (Sodium DodecylSulfate - Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) monodimensionnels, les gels Tris-Glycine-HCl bidimensionnels, les gels de zymographie de gélatine, les gels de zymographie de caséine et les gels de zymographie d'élastine. Après migration des protéines dans les gels Tris-Glycine, elles sont révélées au nitrate d'argent ou transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF), elle-même analysée en radioactivité à l'aide d'un β imager ou révélée par des anticorps (Western Blot).

II. 5. a) Gels d'électrophorèse monodimensionnels

Les gels d'électrophorèse Tris-Glycine-HCl/SDS-PAGE de 1 mm d'épaisseur, contenant 12 % à 15 % d'acrylamide, sont coulés extemporanément au laboratoire avec le système MiniProtean III (Biorad). L'électrophorèse monodimensionnelle en condition dénaturante SDS-PAGE permet la séparation de protéines selon leur poids moléculaire. Le SDS supprime les interactions non covalentes dans la protéine, et conduit donc à sa dénaturation et à la

perte de sa structure. De plus, les ions dodécylsulfate s'adsorbent sur les surfaces exposées de la protéine, formant ainsi un complexe protéine/SDS de charge nette négative. Sous l'action d'un courant électrique, les protéines migrent donc dans le gel et sont séparées selon leur poids moléculaire dans un maillage d'acrylamide.

Les gels sont composés d'un gel de séparation surmonté d'un gel de concentration, préparés dans les proportions indiquées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : composition des gels d'électrophorèse pour 2 gels à 12 % ou 15 % d'acrylamide et 1 mm d'épaisseur

	GEL DE SEPARATION		GEL DE CONCENTRATION 5%
	12%	15%	
Acrylamide à 40%	3,6 mL	4,5 mL	625 µL
Tampon Tris	3 mL Tris 1,5 M, pH 8,8	3 mL Tris 1,5 M, pH 8,8	1,260 mL Tris 1 M, pH 6,8
Glycérol	1,56 g (pesés)	1,56 g (pesés)	-
SDS 10%	120 µL	120 µL	50 µL
H₂O distillée	3,99 mL	3,0 mL	3,035 mL
APS	50 µL	50 µL	25 µL
TEMED	12 µL	12 µL	5 µL

La présence de glycérol dans le gel de séparation permet de couler directement le gel de concentration sur le gel de séparation, sans temps de séchage préalable. Après polymérisation des gels (environ 45 min), le gel est immergé dans le système MiniProtean III en présence de tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3).

Les échantillons préalablement placés dans un tampon de Laemmli 1 X (Tris 50 mM, SDS 2 %, β -mercapto-éthanol 2 %, glycérol 12 %, 0,05 % bleu de bromophénol, pH 6,8) sont chauffés pendant 5 min à 95°C avant leur dépôt sur le gel. La présence de β -mercapto-éthanol permet de dissocier les protéines oligomériques et de réduire les ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires. Les échantillons et le standard de protéines (Precision Plus Protein Standards, All Blue, ref 1610373S04, Biorad) sont déposés dans les puits. Pendant la migration des protéines dans le gel, le gel est soumis à un ampérage constant de 15 mA pendant 15 min pour amener les protéines à s'aligner uniformément dans le gel de concentration, puis de 25 mA pendant 1 h pour séparer les protéines dans le gel de séparation. La migration du gel est arrêtée lorsque le front de migration atteint le bas du gel. Le gel est alors placé dans un tampon de fixation pour une révélation au nitrate d'argent ou dans un tampon de transfert pour un transfert sur une membrane PVDF.

II. 5. b) Gels d'électrophorèse bidimensionnels

La séparation en électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI) et selon leur poids moléculaire (PM), comme illustré en Figure 126.

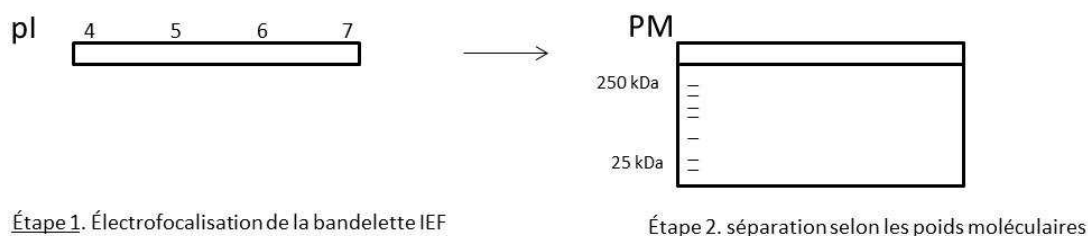


Figure 126 : schéma de principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

La première étape (l'isoélectrofocalisation) sépare les protéines selon leur point isoélectrique dans un gradient de pH. Les gels utilisés sont des bandelettes contenant un gradient de pH de taille 7 x 0,3 cm (Biorad Strip pH 4-7 ref 1632001, strip pH 3-10 ref 1632000), composées à 4% en polyacrylamide et 3% en bis-acrylamide.

L'échantillon est dilué dans un tampon de réhydratation (150 µL de tampon de réhydratation, contenant au maximum 20% d'échantillon, Biorad ref 1632106, conservé à -20°C). Ce tampon est composé d'urée (8 M) facilitant la dénaturation et la solubilisation des protéines, de CHAPS (détergeant zwitterionique, 2%) d'ampholytes (0.2% Bio-Lyte® 3/10) capables de former un gradient de pH dans le gel, de DiThioThrétol (DTT, agent réducteur, 50 mM) et de Bleu de Bromophénol (0,001%), colorant permettant de suivre visuellement l'IEF.

Dans l'étape d'hydratation passive de l'échantillon, le film plastique protégeant la bandelette est retiré et la bandelette est placée au contact de l'échantillon pendant une nuit à température ambiante dans un portoir pour hydratation passive des échantillons (Figure 127).



Figure 127 : image du portoir pour l'hydratation passive des échantillons et de l'appareil IEF Cell (Biorad)

Dans le portoir IEF Cell (Figure 127), des buvards imprégnés d'eau sont placés entre les électrodes et la bandelette, afin d'éviter une dégradation de la bandelette suite à

l'application de fortes tensions. Les bandelettes sont placées dans le portoir et recouverte d'huile minérale (Biorad ref 1632129). Afin d'obtenir une isoélectrofocalisation de bonne qualité, la tension appliquée aux électrodes est augmentée par paliers (Tableau 17).

Tableau 17 : tension appliquée sur les bandelettes IEF en fonction du temps

type de montée	voltage	durée
linéaire	300 V	30 min
linéaire	1 000 V	30 min
linéaire	5 000 V	1 h 30
Rapide	5 000 V	36 min

En fin d'électrofocalisation, le colorant Bleu contenu dans les échantillons doit se trouver du côté de la cathode. L'huile minérale est retirée, puis les bandelettes sont traitées dans une solution d'équilibration préparée extemporanément (Urée 6 M, glycérol 20 %, SDS 2 %, pH 8,8) contenant 10 mg/mL de DTT pendant 15 min, puis dans une deuxième solution d'équilibration préparée extemporanément contenant 25 mg/mL d'iodoacétamide à l'abri de la lumière pendant 15 min. Cette étape permet d'équilibrer les bandelettes de réduire les ponts disulfure entre les cystéines de la protéine et d'inhiber de façon irréversible ces cystéines.

Les bandelettes sont ensuite rincées dans un tampon de migration (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) pendant 10 min, puis déposées à la surface d'un gel SDS-PAGE de 12% ou 15% de polyacrylamide (même composition qu'un gel SDS-PAGE monodimensionnel, préparé extemporanément 1 h avant son utilisation). Le reste du puits est complété avec du gel d'agarose (Biorad ref 1632111), préalablement chauffé au bain-marie pour être liquide.

La seconde étape (séparation des protéines selon leurs poids moléculaires) est réalisée dans le système MiniProtean III en présence de tampon de migration, de façon comparable à l'électrophorèse monodimensionnelle. L'intensité appliquée pour 1 gel est de 10 mA pendant 10 min, de 25 mA pendant 1 h environ (soit 20 mA pendant 10 min puis 50 mA pendant 1 h pour 2 gels). La migration est arrêtée lorsque le front de migration atteint le bas du gel. Une fois la migration terminée, les gels sont soit colorés au nitrate d'argent, soit transférés sur une membrane PVDF.

II. 5. c) Révélation au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse

Les protéines présentes dans le gel d'électrophorèse peuvent être révélées par une coloration au nitrate d'argent. La sensibilité de cette méthode est de 1 ng à 10 ng. La coloration n'est cependant pas complètement uniforme sur toutes les protéines.

Après la migration, le gel est trempé dans une solution de fixation (EtOH 30 %, acide acétique 5 %) pendant 1 h puis dans une nouvelle solution pendant 16 h. Après quatre rinçages à l'eau distillée pendant 10 min, le gel est placé pendant 1 min dans une solution de thiosulfate 0,02 %. Il est ensuite lavé à l'eau distillée pendant 2 min puis placé dans une solution de coloration pendant 45 min à l'abri de la lumière (AgNO_3 11,7 mM, formaldéhyde 0,010 %). Le gel est à nouveau lavé à l'eau distillée pendant 1 min puis placé dans une solution de révélation (Na_2CO_3 226 mM, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,0012 %, formaldéhyde 0,010 %). Après la révélation, le gel est placé dans une solution d'arrêt de coloration (Tris 330 mM, 2 % acide acétique) pendant 15 min. Il est ensuite remplacé dans une solution d'eau distillée et séché entre deux films de plastique (Biorad, ref 1651779).

II. 5. d) Transfert sur membrane PVDF (PolyVinylideneDiFluoride)

Le transfert semi-sec des protéines du gel d'électrophorèse SDS-PAGE vers la membrane PVDF (Sigma-Aldrich, PVDF Immobilon-P, 0,45 μm , P2938-1ROL) est effectué via le système Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell.

La membrane est préalablement lavée avec de l'EtOH puis rincée à l'eau distillée avant d'être immergée dans le tampon de transfert (Tris 50 mM, Glycine 40 mM, SDS 0,375 %, MeOH 20 %, pH 8,3). Après avoir imbibé trois papiers Whatman dans ce même tampon de transfert, une feuille de buvard Whatman, la membrane PVDF humide, le gel et deux papiers Whatman sont placés en couches successives dans l'appareil, entre les deux électrodes selon la description du schéma Figure 128.

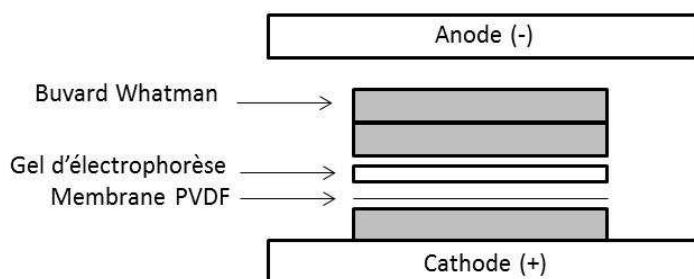


Figure 128 : schéma du transfert sur membrane PVDF

Le transfert des protéines depuis le gel vers la membrane est provoqué par l'application d'un courant de 400 mA pendant 1 h (50 V maximum). Pour une visualisation en radioactivité, la membrane est séchée à l'air libre avant d'être analysée le β mager. Pour une révélation en Western Blot, elle est directement placée dans une solution de blocage (pas de temps de séchage).

II. 5. e) Révélation en anticorps (Western Blot) des protéines sur les membranes PVDF

Les anticorps polyclonaux anti-hMMP-12 et anti-mMMP-12 ont été produits dans le laboratoire du Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI). Ils sont issus respectivement des *sera* prélevés chez des lapins immunisés avec de la hMMP-12 (lapin n°1954 et n°1955) et mMMP-12 (lapin n°1957).

La révélation en anticorps se déroule en 4 temps : la saturation de la membrane, l'incubation avec un anticorps primaire, l'incubation avec un anticorps secondaire, puis la révélation avec un agent coloré, comme présenté en Figure 129.

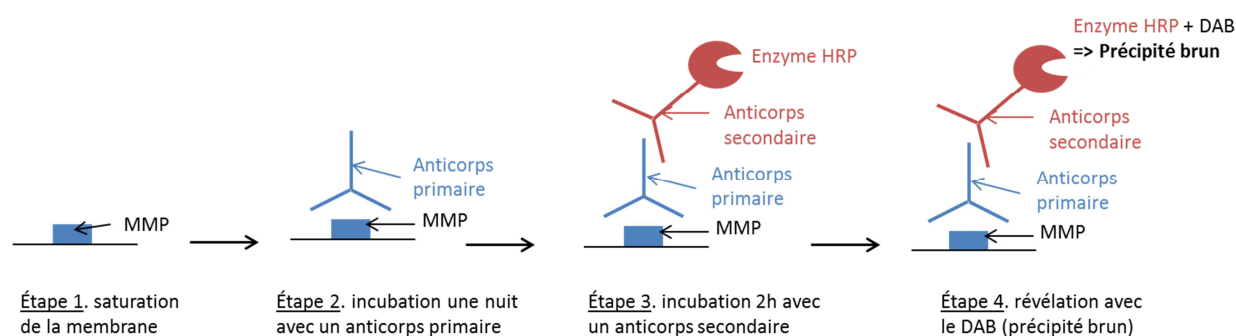


Figure 129 : principe de la révélation en Western Blot avec la diaminobenzidine (DAB)

Après le transfert sur membrane PVDF, la membrane humide est placée dans une solution de saturation (caséine 10 g/L, 1 L PBS, 10 mL thimerosal) pendant 30 min à température ambiante, sous légère agitation. Cette solution sature le plastique et la membrane avec la caséine, limitant les interactions non spécifiques des anticorps avec ceux-ci. La membrane est ensuite placée à 4 °C pendant une nuit dans une solution d'anticorps primaire (anti-mMMP-12 ou anti-hMMP-12, dilution 1/200^{ème}, 50 µL dans 10 mL de solution de blocage), pour une reconnaissance spécifique des MMP. La membrane est lavée avec une solution de PBS/Triton (0,1 % triton) trois fois pendant 5 min puis elle est plongée dans une solution d'anticorps secondaire (anti-lapin-Horseradish peroxidase HRP, Sigma-Aldrich réf. A0545, dilution 1/1 000^{ème}, 10 µL dans 10 mL de solution de blocage, 4 à 11 µg/mL d'après le fournisseur) pendant 2 h, capable de reconnaître les IgG de lapin. La membrane est lavée avec une solution de PBS/Triton une fois pendant 5 min puis avec du PBS pendant 5 min. Pour la solution de révélation, 250 µL de Cobalt (CoCl₂ 0,5 M dans l'eau) et 50 µL de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés à la solution de diaminobenzidine (DAB, réf. 32748, Sigma-Aldrich) dans le PBS (50 mL). En présence de peroxyde d'hydrogène, la HRP catalyse l'oxydation de la DAB en un polymère qui forme un précipité brun à la surface de la membrane, comme indiqué en Figure 130. La sensibilité de cette méthode (500 pg théoriquement détectables) est améliorée avec l'ajout de cobalt. La solution de révélation

est rapidement distribuée sur les différentes membranes ; la révélation dure quelques min sous agitation mécanique. La membrane est lavée 2 fois à l'eau puis séchée à l'air.

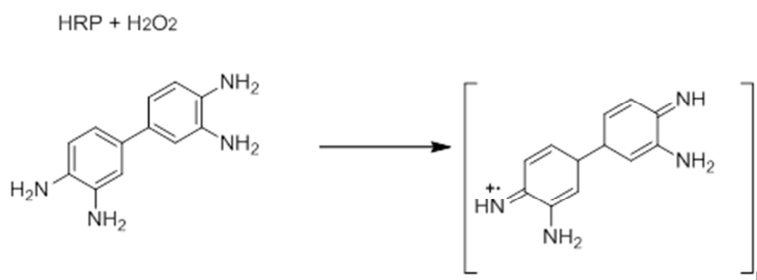


Figure 130 : réaction colorimétrique du DAB avec la HRP et le peroxyde d'hydrogène

II. 5. f) Gels de zymographie de gélatine

Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) peuvent être révélées par zymographie de gélatine. Cette technique repose sur le principe d'un gel d'électrophorèse auquel un substrat (la gélatine) est ajouté dans le gel avant sa polymérisation.

Les échantillons préalablement dilués dans le tampon de zymographie 1 X (2 % SDS, 10 % glycérol, 50 mM Tris, 1% Bleu de Bromophénol) sont déposés sur gels. Les conditions de migration des échantillons sont identiques à celles utilisées pour les gels d'électrophorèse Tris-Glycine-HCl, soit 15 min à une intensité de 15 mA puis 1 h à une intensité de 25 mA pour un seul gel. Après migration des échantillons dans le gel, le SDS est éliminé du gel (étape 1, Figure 131). Pour cela, le gel est placé une solution de Triton 2,5 % dans l'eau distillée, renouvelée plusieurs fois, jusqu'à disparition de la coloration bleue du front de migration. Après des rinçages importants à l'eau distillée (4 fois 15 min), le gel est placé pendant 24 h à 48 h, sous agitation, à 37 °C, dans un tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,4. La protéine se restructure dans le gel et dégrade le substrat (étape 2, Figure 131). Le gel est ensuite coloré (étape 3, Figure 131) au Bleu de Coomassie R250® (0,5 g, 250 mL EtOH, 250 mL d'eau distillée, 5 mL d'acide acétique) puis décoloré (étape 4, Figure 131) dans une solution d'eau distillée/MeOH/acide acétique (60/30/30). Le gel est entièrement bleu ; seules les bandes où la MMP a dégradé la gélatine sont visibles en blanc. Le gel est placé dans de l'eau distillée pour arrêter la décoloration. Les bandes blanches observées reflètent au poids moléculaire de la MMP. Le gel est ensuite séché entre deux films de plastique.

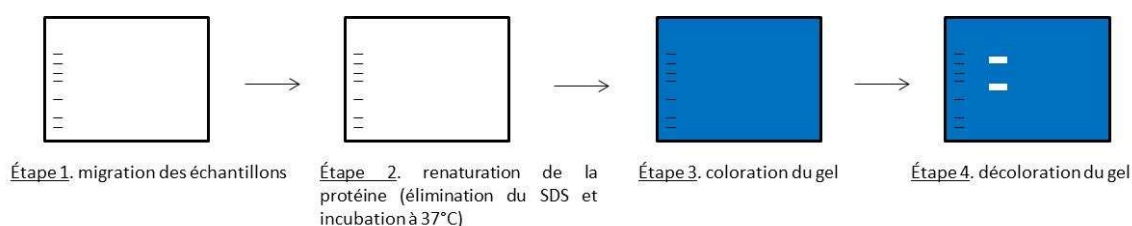


Figure 131 : schéma des principales étapes de zymographie de gélatine

La composition des gels de zymographie est indiquée en Tableau 18.

Tableau 18 : composition des gels de zymographie de gélatine

	GEL DE SEPARATION 10%	GEL DE CONCENTRATION 4%
Acrylamide à 40%	3 mL	500 µL
Tampon Tris	3 mL Tris 1,5 M, pH 8,8	1,260 mL Tris 1 M, pH 6,8
Glycérol	1,56 g (pesés)	-
Gélatine (2 mg/ mL)	1,8 mL à 13,3 mg/ mL	-
SDS 10%	120 µL	50 µL
H₂O distillée	2,85 mL	3,16 mL
APS	50 µL	20 µL
TEMED	12 µL	5 µL

Cette technique permet d'observer à la fois les formes actives des MMP, mais aussi les proformes qui sont activées lors de la renaturation sur gel. Les proformes ont leur site catalytique bloqué par une interaction Cys-Zn²⁺. La présence de SDS pendant la migration de l'échantillon sur le gel supprime cette interaction. Lors de la renaturation, la proforme est ainsi capable de s'auto-activer en coupant son propeptide. Le poids moléculaire de la proforme est bien respecté lors de la migration de la protéine sur le gel, mais lors de l'étape de renaturation, la protéine s'activant, elle est désormais apte à l'hydrolyse de son substrat. La zymographie permet donc l'observation à la fois des formes actives et des proformes des MMP.

II. 5. g) Gels de zymographie de caséine

De la même façon que pour la zymographie de gélatine, il est possible de réaliser de la zymographie de caséine, substrat de la MMP-12. Les gels utilisés ont été commandés chez Biorad (ref 345-0084).

Après dépôt des échantillons sur le gel, les étapes de migration (étape 1) et d'élimination du SDS sont identiques à celles utilisées pour les gels de zymographie de gélatine. Le gel est rincé à l'eau distillée puis incubé dans un tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,4 pendant 48 h. Les conditions de l'étape 3 de coloration et de l'étape 4 de décoloration sont identiques à celles utilisées pour la zymographie de gélatine.

II. 5. h) Gels de zymographie d'élastine

De la même façon que pour la zymographie de gélatine et de caséine, il est possible de réaliser de la zymographie d'élastine, substrat de la mMMP-12. L'élastine (Sigma-Aldrich

Elastin from bovine neck ligament, ref E-6527) est utilisée à 4 mg/mL dans un gel SDS-PAGE à 10 % en acrylamide. La composition des gels est détaillée en Tableau 19.

Tableau 19 : composition des gels de zymographie d'élastine

	GEL DE SEPARATION 10%	GEL DE CONCENTRATION 4%
Acrylamide à 40%	3 mL	500 µL
Tampon Tris	3 mL Tris 1,5 M, pH 8,8	1,260 mL Tris 1 M, pH 6,8
Glycérol	1,56 g (pesés)	-
Elastine (4 mg/ mL)	1,8 mL à 26,6 mg/ mL	-
SDS 10%	120 µL	50 µL
H₂O distillée	2,85 mL	3,16 mL
APS	50 µL	20 µL
TEMED	12 µL	5 µL

Après migration des échantillons dans le gel, élimination du SDS par une solution de Triton 2,5 % et lavage à l'eau distillée, le gel est placé dans une solution de renaturation (Tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 5 µM, pH 7.4) pendant 72 h à 37 °C sous agitation. Le protocole de coloration et de décoloration du gel est identique à celui réalisé pour le gel de zymographie de gélatine.

II. 6. Protocole d'aspiration pharyngique et de lavage bronchoalvéolaire

Les nanoparticules ultrafines de carbone black (ufCB, Printex 90, Orion Engineered Carbons, Allemagne) ont été pesées et suspendues dans une solution de tampon phosphate (PBS, pH 7,4) et dispersées par ultrasonication pendant 20 min (750 W, 28% d'amplitude).

Les souris mâles C57BL6 sauvages et MMP-12^{-/-} ont été fournies par Charles Rivers (France). A l'âge de 7 semaines, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane 2 %. L'exposition aux nanoparticules (300 µg de nanoparticules dans 80 µL de PBS par souris) par aspiration pharyngique a été réalisée comme décrit dans la littérature.¹⁹⁹ Les souris contrôle ont reçu 80 µL de PBS par aspiration pharyngique. Après 3 jours d'exposition, les souris ont été euthanasiées par injection intrapéritonéale avec un mélange de kétamine (150 mg/kg) et de xylazine (15 mg/kg). Pour réaliser le lavage bronchoalvéolaire (BAL) avec 1 mL de PBS, les poumons des souris ont été exposés et la trachée a été cannulée (Figure 132).



Figure 132: lavage bronchoalvéolaire des souris

Les BAL ont été immédiatement récupérés et centrifugés à $300 \times g$ pendant 10 min at 4°C . Les surnageants ont été immédiatement dilués par deux dans du tampon 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , 0.01% Brij-35, pH 6,8, en présence de cocktail d'inhibiteur (1 % v/v, Sigma P8340). La sonde **2** ou les compétiteurs ont été ajoutés, le plus rapidement possible afin de limiter la dégradation des MMP par les protéases.

II. 7. Protocole d'extraction des aortes et carotides

Le tampon d'extraction contenant 50 mM Tris, 10 mM CaCl_2 , 0,1 % brij-35, 2 M Urée, 1 M NaCl, 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma P8340), pH 6,8 a été fraîchement préparé. Les aortes et les carotides encore ont été découpées rapidement au scalpel en une quinzaine de petits morceaux et placées dans des eppendorfs de 2 mL avant l'ajout de 1 mL de tampon d'extraction. Après 30 min d'agitation mécanique sur glace, les eppendorfs contenant les aortes et les carotides ont été centrifugées à $10\,000\text{ g}$ à 4°C pendant 1 h. Suite à cette centrifugation, seuls les surnageants ont été utilisés pour les expériences de marquage ou de zymographie. Deux protocoles ont été utilisés : dans le premier, la sonde est ajoutée directement dans le tampon d'extraction et l'eppendorf a été placé à l'abri de la lumière jusqu'à l'étape d'irradiation ; dans le second protocole, la sonde a été ajoutée après récupération des surnageants, suite à la centrifugation. Une seconde extraction dans les mêmes conditions a été réalisée.

- ¹ Gross J., Lapiere C.M. (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1014-1022
- ² Bode W., Gomis-Rüth F.X., Stöckler W. (1993) Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134-140
- ³ Nagase H., Woessner J.F. (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494
- ⁴ Nagase H., Woessner J.F. (2000) Matrix metalloproteinases and TIMPs. *New York: Oxford Univ. Press*
- ⁵ Shapiro S.D., Kobayashi D.K., Ley T.J. (1993) Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**, 23824-23829
- ⁶ Mott J.D., Werb Z. (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 558-564
- ⁷ Hu J., Van den Steen P.E., Sang Q.X., Opdenakker G. (2007) Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 480-498
- ⁸ Lee S., Jilani S.M., Nikolova G.V., Carpizo D., Iruela-Arispe M.L. (2005) Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* **169**, 681-691
- ⁹ Dong Z.Y., Kumar R., Yang X.L., Fidler I.J. (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma, *Cell* **88**, 801-810
- ¹⁰ O'Reilly M.S., Wiederschain D., Stetler-Stevenson W.G., Folkman J., Moses M.A. (1999) Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J. Biol. Chem.* **274**, 29568-29571
- ¹¹ Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 221-233
- ¹² Alexander C.M., Hansell E.J., Behrendtsen O., Flannery M.L., Kishnani N.S., Hawkes S.P., Werb Z. (1996) Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* **122**, 1723-1736
- ¹³ Engeblad M., Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev.* **2**, 161-174

- ¹⁴ Currie J.C., Fortier S., Sina A., Galipeau J., Cao J., Annabi B. (2007) MT1-MMP downregulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: A molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J. Biol. Chem.* **282**, 8142-8149
- ¹⁵ Tayebjee M.H., Lip G.Y., MacFadyen R.J. (2005) Matrix metalloproteinases in coronary artery disease: Clinical and therapeutic implications and pathological significance. *Curr. Med. Chem.* **12**, 917-925
- ¹⁶ Murphy G., Nagase H. (2008) Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: Destruction or repair? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4**, 128-135
- ¹⁷ Yong V.W. (2005) Metalloproteinases: Mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 931-944
- ¹⁸ Filippov S., Koenig G.C., Chun T.H., Hotary K.B., Ota I., Bugge T.H., Roberts J.D., Fay W.P., Birkedal-Hansen H., Holmbeck K., Sabeh F., Allen E.D., Weiss S.J. (2005) MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J. Exp. Med.* **202**, 663-671
- ¹⁹ Parks W.C., Wilson C.L., López-Boado Y.S. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 617-629
- ²⁰ Bramhall S.R., Rosemurgy A., Brown P.D., Bowry C., Buckels J.A. (2001) Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: A randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3447-3455
- ²¹ Coussens L.M., Fingleton B., Matrisian L.M. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations. *Science* **295**, 2387-2392
- ²² Overall C.M., Lopez-Otin C. (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 657-672
- ²³ Balbin M., Fueyo A., Tester A.M., Pendas A.M., Pitiot A.S., Astudillo A., Overall C.M., Shapiro S.D., Lopez-Otin C. (2003) Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat. Genet.* **35**, 252-257
- ²⁴ Overall C.M., Kleifeld O. (2006) Tumour microenvironment-opinion: Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 227-239
- ²⁵ Lopez-Otin C., Matrisian L.M. (2007) Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 800-808
- ²⁶ Martin M.D., Matrisian L.M. (2007) The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 717-724
- ²⁷ Holmbeck K., Bianco P., Caterina J., Yamada S., Kromer M., Kuznetsov S.A., Mankani M., Robey P.G., Poole A.R., Pidoux I., Ward J.M., Birkedal-Hansen H. (1999) MT1-MMP-deficient

mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* **99**, 81-92

²⁸ Lee H., Overall C.M., McCulloch C.A., Sodek J. (2006) A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4812-4826

²⁹ Doucet A., Butler G.S., Rodriguez D., Prudova A., Overall C.M. (2008) Metadegradomics: Toward *in vivo* quantitative degradomics of proteolytic post-translational modifications of the cancer proteome. *Mol. Cell Proteomics* **7**, 1925-1951

³⁰ Lopez-Otin C., Overall C.M. (2002) Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 509-519

³¹ Wilson C.L., Ouellette A.J., Satchell D.P., Ayabe T., Lopez-Boado Y.S., Stratman J.L., Hultgren S.J., Matrisin L.M., Parks W.C. (1999) Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* **286**, 113-117

³² McQuibban G.A., Gong J.H., Tam E.M., McCulloch C.A., Clark-Lewis I., Overall C.M. (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* **289**, 1202-1206

³³ Tam E.M., Morrison C.J., Wu Y.I., Stack M.S., Overall C.M. (2004) Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6917-6922

³⁴ Dean R.A., Butler G.S., Hamma-Kourbali Y., Delbe J., Brigstock D.R., Courty J., Overall C.M. (2007) Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: Disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affinity regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/Connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8454-8465

³⁵ Gearing A.J., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A.H., Drummond A.H., Galloway W.A., Gilbert R., Gordon J.L., Leber T.M., Mangan M., Miller K., Nayee P., Owen K., Patel S., Thomas W., Wells G., Wood L.M., Woolley K. (1994) Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* **370**, 555-557

³⁶ Schonbeck U., Mach F., Libby P. (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: A novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J. Immunol.* **161**, 3340-3346

³⁷ Puente X.S., Sanchez L.M., Overall C.M., Lopez-Otin C. (2003) Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 544-558

³⁸ Butler G.S., Dean R.A., Tam E.M., Overall C.M. (2008) Pharmacoproteomics of a metalloproteinase hydroxamate inhibitor in breast cancer cells: Dynamics of membrane type

1 matrix metalloproteinase-mediated membrane protein shedding. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4896-4914

³⁹ Kopitz C., Gerg M., Bandapalli O.R., Ister D., Pennington C.J., Hauser S., Flechsig C., Krell H.W., Antolovic D., Brew K., Nagase H., Stangl M., von Weyhern C.W., Brucher B.L., Brand K., Coussens L.M., Edwards D.R., Kruger A. (2007) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res.* **67**, 8615-8623

⁴⁰ Greenlee K.J., Werb Z., Kheradmand F. (2007) Matrix metalloproteinases in lung: Multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol. Rev.* **87**, 69-98

⁴¹ Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. (2010) Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **141**, 52-56

⁴² Werb Z., Gordon S. (1975) Elastase secretion by stimulated macrophages. Characterization and regulation. *J. Exp. Med.* **142**, 361-377

⁴³ Banda M.J., Werb Z. (1981) Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. *Biochem. J.* **193**, 589-605

⁴⁴ Shapiro S.D., Griffin G.L., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Copeland N.G., Welgus H.G., Senior R.M., Ley T.J. (1992) Molecular cloning, chromosomal localization, and bacterial expression of a murine macrophage metalloelastase. *J. Biol. Chem.* **26**, 4664-4671

⁴⁵ Gronski T.J., Martin R.L., Kobayashi D.K., Walsh B.C., Holman M.C., Huber M., Van Wart H.E., Shapiro S.D. (1997) Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* **272**, 12189-12194

⁴⁶ Belaaouaj A., Shipley J.M., Kobayashi D.K., Zimonjic D.B., Popescu N., Silverman G.A., Shapiro S.D. (1995) Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **270**, 14568-14575

⁴⁷ Shipley J.M., Wesselschmidt R.L., Kobayashi D.K., Ley T.J., Shapiro S.D. (1996) Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3942-3946

⁴⁸ Houghton A.M., Hartzell W.O., Robbins C.S., Gomis-Rüth F.X., Shapiro S.D. (2009) Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* **460**, 637-641

⁴⁹ <http://copd.about.com/od/complicationsofcopd/ig/Complications-Image-Gallery/17055.htm>

⁵⁰ Hunninghake G.M., Cho M.H., Tesfaigzi Y., Soto-Quiros M.E., Avila L., Lasky-Su J., Stidley C., Melen E., Soderhall C., Hallberg J., Kull I., Kere J., Svartengren M., Pershagen G., Wickman M., Lange C., Demeo D.L., Hersh C.P., Klanderman B.J., Raby B.A., Sparrow D., Shapiro S.D.,

Silverman E.K., Litonjua A.A., Weiss S.T., Celedon J.C. (2009) MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2599-2608

⁵¹ Chaudhuri R., McSharry C., Brady J., Donnelly I., Grierson C., McGuinness S., Jolly L., Weir C.J., Messow C.M., Spears M., Miele G., Nocka K., Crowther D., Thompson J., Brannigan M., Lafferty J., Sproule M., Macnee W., Connell M., Murchison J.T., Shepherd M.C., Feuerstein G., Miller D.K., Thomson N.C. (2012) Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: Relationship to disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 655-663

⁵² Morris D.G., Huang X., Kaminski N., Wang Y., Shapiro S.D., Dolganov G., Glick A., Sheppard D. (2003) Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* **422**, 169-173

⁵³ Libby P., Aikawa M. (2002) Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine* **8**, 1257-1262

⁵⁴ Galis Z.S., Sukhova G.K., Lark M.W., Libby P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **94**, 2493-2503

⁵⁵ Galis Z.S., Khatir J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis - The good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* **90**, 251-262

⁵⁶ George S.J. (1998) Tissue inhibitors of metalloproteinases and metalloproteinases in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **9**, 413-423

⁵⁷ Newby A.C. (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol. Rev.* **85**, 1-31

⁵⁸ Dollery C.M., Libby P. (2006) Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc. Res.* **69**, 625-635

⁵⁹ Johnson J.L., George S.J., Newby A.C., Jackson C.L. (2005) Divergent effects of matrix metalloproteinase-3, metalloproteinase-7, metalloproteinase-9, and metalloproteinase-12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15575-15580

⁶⁰ Liang J.Y., Liu E., Yu Y., Kitajima S., Koike T., Jin Y., Morimoto M., Hatakeyama K., Asada Y., Watanabe T., Sasaguri Y., Watanabe S., Fan J. (2006) Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* **113**, 1993-2001

⁶¹ Halpert I., Sires U.I., Roby J.D., Potter-Perigo S., Wight T.N., Shapiro S.D., Welgus H.G., Wickline S.A., Parks W.C. (1996) Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9748-9753

- ⁶² Morgan A.R., Rerkasem K., Gallagher P.J., Zhang B., Morris G.E., Calder P.C., Grimble R.F., Eriksson P., McPheat W.L., Shearman C.P., Ye S. (2004) Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics. *Stroke* **35**, 1310-1315
- ⁶³ Jormsjo S., Ye S., Moritz J., Walter D.H., Dimmeler S., Zeiher A.M., Henney A., Hamsten A., Eriksson P. (2000) Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ. Res.* **86**, 998-1003
- ⁶⁴ Hyafil F., Vucic E., Cornily J.C., Sharma R., Amirbekian V., Blackwell F., Lancelot E., Corot C., Fuster V., Galis Z.S., Feldman L.J., Fayad Z.A. (2011) Monitoring of arterial wall remodelling in atherosclerotic rabbits with a magnetic resonance imaging contrast agent binding to matrix metalloproteinases. *Eur. Heart J.* **32**, 1561-1571
- ⁶⁵ Razavian M., Tavakoli S., Zhang J., Nie L., Dobrucki L.W., Sinusas A.J., Azure M., Robinson S., Sadeghi M.M. (2011) Atherosclerosis plaque heterogeneity and response to therapy detected by *in vivo* molecular imaging of matrix metalloproteinase activation. *J. Nucl. Med.* **52**, 1795-1802
- ⁶⁶ Tavakoli S., Razavian M., Zhang J., Nie L., Marfatia R., Dobrucki L.W., Sinusas A.J., Robinson S., Edwards D.S., Sadeghi M.M. (2011) Matrix metalloproteinase activation predicts amelioration of remodeling after dietary modification in injured arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 102-109
- ⁶⁷ Zhang J., Nie L., Razavian M., Ahmed M., Dobrucki L.W., Asadi A., Edwards D.S., Azure M., Sinusas A.J., Sadeghi M.M. (2008) Molecular imaging of activated matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Circulation* **118**, 1953-1960
- ⁶⁸ Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., Van Wart H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 364-368
- ⁶⁹ Van Wart H.E., Birkedal-Hansen H. (1990) The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 5578-5582
- ⁷⁰ Brinckerhoff CE, Matrisian LM. (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 207-214
- ⁷¹ Whittaker M., Floyd C. D., Brown P., Gearing A. J. (1999) Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev*, **9**, 2735-76

- ⁷² Manka S.W., Carafoli F., Visse R., Bihan D., Raynal N., Farndale R.W., Murphy G., Enghild J.J., Hohenester E., Nagase H. (2012) Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12461-12466
- ⁷³ Bertini I., Calderone V., Fragai M., Jaiswal R., Luchinat C., Melikian M., Mylonas E., Svergun D.I. (2008) Evidence of reciprocal reorientation of the catalytic and hemopexin-like domains of full-length MMP-12. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7011-7021
- ⁷⁴ Lovejoy B., Cleasby A., Hassell A.M., Longley K., Luther M.A., Weigl D., McGeehan G., McElroy A.B., Drewry D., Lambert M.H., Jordan S.R. (1994) Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* **263**, 375-377
- ⁷⁵ Stöcker W., Bode W. (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: The metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 383-390
- ⁷⁶ Gomis-Rüth F.X. (2009) Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J. Biol. Chem.* **284**, 15353-15357
- ⁷⁷ Babine R.E., Bender S.L. (1997) Molecular Recognition of Protein-ligand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem. Rev.* **97**, 1359-1472
- ⁷⁸ Moy F.J., Chanda P.K., Chen J., Cosmi S., Edris W., Levin J.I., Rush T.S., Wilhelm J., Powers R. (2002) Impact of mobility on structure-based drug design for the MMPs. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12658-12659
- ⁷⁹ Devel L., Czarny B., Beau F., Georgiadis D., Stura E., Dive V. (2010) Third generation of matrix metalloprotease inhibitors: Gain in selectivity by targeting the depth of the S₁' cavity. *Biochimie* **92**, 1501-1508
- ⁸⁰ Yiotakis A., Dive V. (2008) Synthetic active site-directed inhibitors of metzincins: Achievement and perspectives. *Mol. Aspects Med.* **29**, 329-338
- ⁸¹ Bertini I., Calderone V., Cosenza M., Fragai M., Lee Y.M., Luchinat C., Mangani S., Terni B., Turano P. (2005) Conformational variability of matrix metalloproteinases: Beyond a single 3D structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5334-5339
- ⁸² Shieh H.S., Tomasselli A.G., Mathis K.J., Schnute M.E., Woodard S.S., Caspers N., Williams J.M., Kiefer J.R., Munie G., Wittwer A., Malfait A.M., Tortorella M.D. (2011) Structure analysis reveals the flexibility of the ADAMTS-5 active site. *Protein Sci.* **20**, 735-744
- ⁸³ Cheng X.C., Fang H., Xu W.F. (2008) Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **23**, 154-167
- ⁸⁴ Krizkova S., Zitka O., Masarik M., Adam V., Stiborova M., Eckschlager T., Chavis G.J., Kizek R. (2011) Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *Trends Anal. Chem.* **30**, 1819-1832
- ⁸⁵ Snoek-van Beurden P.A.M., Von den Hoff J.W. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* **38**, 73-83

- ⁸⁶ Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. (1994) Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* **218**, 325-329.
- ⁸⁷ Woessner J.F. (1995) Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods in enzymology* **31**, 510-528
- ⁸⁸ Barbosa F., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E. (2006) Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**, 559-564
- ⁸⁹ Sepper R., Konttinen Y.T., Sorsa T., Koski H. (1994) Gelatinolytic and type IV collagenolytic activity in bronchiectasis. *Chest* **106**, 1129-1133
- ⁹⁰ Troeberg L, Nagase H. (2003) Zymography of metalloproteinases. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **21**, 15.1-15.12
- ⁹¹ Fernandez-Resa P., Mira E., Quesada A.R. (1995) Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.* **224**, 434-435
- ⁹² Zeng Z.S., Shu W.P., Cohen A.M. (2002) Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: Evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin. Cancer Res.* **8**, 144-148
- ⁹³ Raser K.J., Posner A., Wang K.K. (1995) Casein zymography: A method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Arch. Biochem. Biophys.* **10**, 211-216
- ⁹⁴ Gogly B., Groult N., Hornebeck W., Godeau G., Pellat B. (1998) Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal. Biochem.* **255**, 211-216
- ⁹⁵ Hautamaki R.D., Kobayashi D.K., Senior R.M., Shapiro S.D. (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* **277**, 2002-2004
- ⁹⁶ Hao L., Du M., Lopez-Campistrous A., Fernandez-Patron C. (2004) Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ. Res.* **94**, 68-76
- ⁹⁷ Yu W., Woessner J.F. (2001) Heparin-enhanced zymographic detection of matrilysin and collagenases. *Anal. Biochem.* **293**, 38-42
- ⁹⁸ Yan S.J., Blomme E.A.G. (2003) *In situ* zymography: A molecular technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Vet. Pathol.* **40**, 227-236
- ⁹⁹ George S.J., Johnson J.L. *In situ* zymography: Methods in molecular biology. (2001) **151**, *Matrix Metalloproteinase Protocols*, 411-415, Ed Clark
- ¹⁰⁰ Nemori R., Yamamoto M., Kataoka F., Haschimoto G., Arakatsu H., Shiomi T., Okada Y. (2005) Development of *in situ* zymography to localize active matrix metalloproteinase-7 (matrilysin-1) *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 1227-1234

- ¹⁰¹ Wilkesman J., Kurz L. (2009) Protease analysis by zymography: A review on techniques and patents. *Recent Pat. Biotechnol.* **3**, 175-184.
- ¹⁰² Frederiks W.M., Mook O.R.F. (2004) Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on *in situ* zymography of gelatinases: Review and protocols. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 711-722
- ¹⁰³ Hattori S., Fujisaki H., Kiriya T., Yokoyama T., Irie S. (2002) Real-time zymography and reverse zymography: A method for detecting activities of matrix metalloproteinases and their inhibitors using FITC-labeled collagen and casein as substrates. *Anal. Biochem.* **301**, 27-34
- ¹⁰⁴ Watanabe K., Hattori S. (2002) Real-time dual zymography analysis of matrix metalloproteinases using fluorescein-isothiocyanate-labeled gelatin and Texas-red-labeled casein. *Anal. Biochem.* **307**, 390-392
- ¹⁰⁵ Sorsa T., Salo T., Koivunen E., Tynnelä J., Kontinen Y.T., Bergmann U. (1997) Activation of type IV procollagenases by human tumor associated trypsin-2. *J. Biol. Chem.* **272**, 21067-21074
- ¹⁰⁶ Sunada H., Nagai Y. (1980) A rapid micro-assay method for gelatinolytic activity using tritium-labeled heat-denatured polymeric collagen as a substrate and its application to the detection of enzymes involved in collagen metabolism. *J. Biochem.* **87**, 1765-1771
- ¹⁰⁷ Manicourt D.H., Lefebvre V. (1993) An assay for matrix metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycans, casein or gelatin. *Anal. Biochem.* **215**, 171-179
- ¹⁰⁸ Senior R.M., Griffin G.L., Fliszar C.J., Shapiro S.D., Goldberg G.I., Welgus H.G. (1991) Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.* **266**, 7870-7875
- ¹⁰⁹ Terato K., Nagai Y., Kawanishi K., Yamamoto S. (1976) A rapid assay method of collagenase activity using ¹⁴C-labeled soluble collagen as substrate. *Biochim. Biophys. Acta.* **445**, 753-762
- ¹¹⁰ Koshy P.J.T., Rowan A.D., Life P.F., Cawston T.E. (1999) 96-well plate assays for measuring collagenase activity using ³H-acetylated collagen. *Anal. Biochem.* **175**, 202-207
- ¹¹¹ Paemen L., Martens E., Norga K., Masure S., Roets E., Hoogmartens J., Opdenakker G. (1996) The gelatinase inhibitory activity of tetracyclines and chemically modified tetracycline analogues as measured by a novel microtiter assay for inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 105-111
- ¹¹² Koritsas V.M., Atkinson H.J. (1995) An assay for detecting nanogram levels of proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **227**, 22-26

- ¹¹³ Ratnikov B., Deryugina E., Leng J., Marchenko G., Dembrow D., Strongin A. (2000) Determination of matrix metalloproteinase activity using biotinylated gelatin. *Anal. Biochem.* **286**, 149-155
- ¹¹⁴ Bawadi H.A., Antunes T.M., Shih F., Losso J.N. (2004) *In vitro* inhibition of the activation of pro-matrix metalloproteinase 1 (pro-MMP-1) and pro-matrix metalloproteinase 9 (pro-MMP-9) by rice and soybean Bowman-Birk inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4730-4736
- ¹¹⁵ Rao S.K., Mathrubutham M., Karteron A., Sorensen J.R. (1997) A versatile microassay for elastase using succinylated elastin. *Anal. Biochem.* **250**, 222-227
- ¹¹⁶ Baragi V.M., Shaw B.J., Renkiewicz R.R., Kuipers P.J., Welgus H.G., Cohen J.R., Rao S.K. (2000) A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin. *Matrix Biol.* **19**, 267-273
- ¹¹⁷ Grimm T., Schäfer A., Högger P. (2004) Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic. Biol. Med.* **15**, 811-822
- ¹¹⁸ Menges D.A., Ternullo D.L., Tan-Wilson A.L., Gal S. (1997) Continuous assay of proteases using a microtiter plate fluorescence reader. *Anal. Biochem.* **254**, 144-147
- ¹¹⁹ Kong D.H., Jung S.H., Lee S.T., Ha K.S. (2010) On-chip assay of matrix metalloproteinase-3 activity using fluorescence-conjugated gelatin arrays. *BioChip J.* **43**, 210-216
- ¹²⁰ Gao L., Mbonu N., Cao L., Gao D. (2008) Label-free colorimetric detection of gelatinases using nanoporous silicon photonic films. *Anal. Chem.* **80**, 1468-1473
- ¹²¹ Jung S.H., Kong D.H., Park J.H., Lee S.T., Hyun J., Kim Y.M., Ha K.S. (2010) Rapid analysis of matrix metalloproteinase-3 activity by gelatin arrays using a spectral surface plasmon resonance biosensor. *Analyst* **135**, 1050-1057
- ¹²² Lombard C., Saulnier J., Wallach J. (2005) Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: A review. *Biochimie* **87**, 265-272
- ¹²³ Stack M.S., Gray R.D., (1989) Comparison of vertebrate collagenase and gelatinase using a new fluorogenic substrate peptide. *J. Biol. Chem.* **264**, 4277-4281
- ¹²⁴ Knight C.G., Willenbrock F., Murphy G. (1992) A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.* **296**, 263-266
- ¹²⁵ Neumann U., Kubota H., Frei K., Ganu V., Leppert D. (2004) Characterization of Mca-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, a fluorogenic substrate with increased specificity constants for collagenases and tumor necrosis factor converting enzyme. *Anal. Biochem.* **328**, 166-173
- ¹²⁶ Beekman B., Drijfhout J.W., Bloemhoff W., Ronday H.K., Tak P.P., Koppolo J.M. (1996) Convenient fluorometric assay for matrix metalloproteinase activity and its application in biological media. *FEBS Lett.* **390**, 221-225

- ¹²⁷ Beekman B., van El B., Drijfhout J.W., Rodaya H.K., TeKoppele J.M. (1997) Highly increased levels of active stromelysin in rheumatoid synovial fluid determined by a selective fluorogenic assay. *FEBS Lett.* **418**, 305-309
- ¹²⁸ Nagase H., Fields C.G., Fields G.B. (1994) Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3). *J. Biol. Chem.* **269**, 20952-20957
- ¹²⁹ Knäuper V., López-Otin C., Smith B., Knight G., Murphy G. (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* **271**, 1544-1550
- ¹³⁰ Devel L., Rogakos V., David A., Makaritis A., Beau F., Cuniasse P., Yiotakis A., Dive V. (2006) Development of selective inhibitors and substrate of matrix metalloproteinase-12. *J. Biol. Chem.* **281**, 11152-11160
- ¹³¹ Lauer-Fields J.L., Broder T., Sritharan T., Chung L., Nagase H., Fields G.B. (2001) Kinetic analysis of matrix metalloproteinase activity using fluorogenic triple-helical substrates. *Biochem.* **40**, 5795-5803
- ¹³² Lauer-Fields J.L., Sritharan T., Stack M.S., Nagase H., Fields G.B. (2003) Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J. Biol. Chem.* **278**, 18140-18145
- ¹³³ Cheng W., Chen Y., Yan F., Ding L., Ding S., Ju H., Yin Y. (2011) Ultrasensitive scanometric strategy for detection of matrix metalloproteinases using a histidine tagged peptide–Au nanoparticle probe. *Chem. Comm.* **47**, 2877-2879
- ¹³⁴ Verheijen J.H., Nieuwenbroek N.M., Beekman B., Hanemaaijer R., Verspaget H.W., Roday H.K., Bakker A.H. (1997) Modified proenzymes as artificial substrates for proteolytic enzymes: Colorimetric assay of bacterial collagenase and matrix metalloproteinase activity using modified pro-urokinase. *Biochem. J.* **323**, 603-609
- ¹³⁵ Hanemaaijer R., van Lent N., Visser H., Verheijen J. (1999) Methods to increase the sensitivity of the MMP-9 activity assay. *Life Science News* **3**, 8-9
- ¹³⁶ Hanemaaijer R., Visser H., Kontiiner Y., Koolwijk P., Verheijen J.H. (1998) A novel and simple immunocapture assay for determination of gelatinase-B (MMP-9) activities in biological fluids: Saliva from patients with Sjogren's syndrome contain increased latent and active gelatinase-B levels. *Matrix Biol.* **17**, 657-665
- ¹³⁷ Hanemaaijer R., Sier C.F., Visser H., Scholte L., van Lent N., Toet K., Hoekman K., Verheijen J.H. (1999) MMP-9 activity in urine from patients with various tumors, as measured by a novel MMP activity assay using modified urokinase as a substrate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **878**, 141-149

- ¹³⁸ Capper S.J., Verheijen J., Smith L., Sully M., Visser H., Hanemaaijer R. (1999) Determination of gelatinase-A (MMP-2) activity using a novel immunocapture assay. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **878**, 487–490
- ¹³⁹ Vernooy J.H.J., Lindeman J.H.N., Jacobs J.A., Hanemaaijer R., Wouters E.F.M. (2004) Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced *sputum* from patients with COPD. *Chest* **126**, 1802-1810
- ¹⁴⁰ Lauer-Fields J.L., Nagase H., Fields G.B. (2004) Development of a solid-phase assay for analysis of matrix metalloproteinase activity. *J. Biomol. Tech.* **15**, 305-316.
- ¹⁴¹ LaPan P., Brady J., Grierson C., Fleming M., Miller D., Sypek J., Fu B. (2010) Optimization of total protein and activity assays for the detection of MMP-12 in induced human *sputum*. *BMC Pulmonary Medicine* **10**, 40
- ¹⁴² Pieper-Furst U., Kleuser U., Stocklein W. F., Warsinke A., Scheller F. W. (2004) Detection of subpicomolar concentrations of human matrix metalloproteinase-2 by an optical biosensor. *Anal. Biochem.* **332**, 160-167
- ¹⁴³ Brown S., Bernardo M., Li Z. H., Kotra L. P., Tanaka Y., Fridman R., Mobashery S. (2000) Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6799-6800
- ¹⁴⁴ Ikejiri M., Bernardo M.M., Meroueh S.O., Brown S., Chang M., Fridman R., Mobashery S. (2005) Design, synthesis, and evaluation of a mechanism-based inhibitor for gelatinase A. *J. Org. Chem.* **70**, 5709-5712
- ¹⁴⁵ Kruger A., Arlt M.J.E., Gerg M., Kopitz C., Bernardo M.M., Chang M., Mobashery S., Fridman R. (2005) Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res.* **65**, 3523-3526
- ¹⁴⁶ Hesek D., Toth M., Krchnak V., Fridman R., Mobashery S. (2006) Synthesis of an inhibitor-tethered resin for detection of active matrix metalloproteinases involved in disease. *J. Org. Chem.* **71**, 5848-5854
- ¹⁴⁷ Hesek D., Toth M., Meroueh S.O., Brown S., Zhao H., Sakr W., Fridman R., Mobashery S. (2006) Design and characterization of a metalloproteinase inhibitor-tethered resin for the detection of active MMPs in biological samples. *Chemistry & Biology* **13**, 379-386
- ¹⁴⁸ Gervasi D.C., Raz A., Dehem M., Yang M., Kurkinen M., Fridman R. (1996) Carbohydrate-mediated regulation of matrix metalloproteinase-2 activation in normal human fibroblasts and fibrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 530-538
- ¹⁴⁹ Freije J.R., Bischoff R. (2003) Activity-based enrichment of matrix metalloproteinases using reversible inhibitors as affinity ligands. *J. Chrom. A.* **1009**, 155-169

- ¹⁵⁰ Freije J.R., Klein T., Ooms J.A., Franke J.P., Bischoff R. (2006) Activity-based matrix metalloprotease enrichment using automated, inhibitor affinity extractions. *J. Prot. Res.* **5**, 1186-1194
- ¹⁵¹ Freije R., Klein T., Ooms B., Kauffman H., Bischoff R. (2008) An integrated high-performance liquid chromatography-mass spectrometry system for the activity-dependent analysis of matrix metalloproteases. *J. Chrom. A.* **1189**, 417-425
- ¹⁵² Dragoni E., Calderone V., Fragai M., Jaiswal R., Luchinat R., Nativi C. (2009) Biotin-tagged probes for MMP expression and activation: Design, synthesis, and binding properties. *Bioconjug. Chem.* **20**, 719-727
- ¹⁵³ Bregant S., Huillet C., Devel L., Dabert-Gay A.S., Beau F., Thai R., Czarny B., Yiotakis A., Dive V. (2009) Detection of matrix metalloproteinase active forms in complex proteomes: Evaluation of affinity versus photoaffinity capture. *J. Prot. Res.* **8**, 2484-2494
- ¹⁵⁴ Evans M.J., Cravatt B.F. (2006) Mechanism-based profiling of enzyme families. *Chem. Rev.* **106**, 3279-3301
- ¹⁵⁵ Liu Y., Patricelli M.P., Cravatt B.F. (1999) Activity-based protein profiling: The serine hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 14694-14699
- ¹⁵⁶ Patricelli M.P., Giang D.K., Stamp L.M., Brubaum J.J. (2001) Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probe. *Proteomics* **1**, 1067-1071
- ¹⁵⁷ Kidd D., Liu Y., Cravatt B.F. (2001) Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. *Biochem.* **40**, 4005-4015
- ¹⁵⁸ Jonhson D.S., Weerapana E., Cravatt B.F. (2010) Strategies for discovering and derisking covalent, irreversible enzyme inhibitors. *Future Med. Chem.* **2**, 949-964
- ¹⁵⁹ Thornberry N.A., Peterson E.P., Zhao J.J., Howard A.D., Griffin P.R., Chapman K.T. (1994) Inactivation of interleukin-1 β converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochem.* **33**, 3934-3940
- ¹⁶⁰ Falgoutret J.P., Black W.C., Cromlish W., Desmarais S., Lamontagne S., Mellon C., Riendeau D., Rodan S., Tawa P., Wesolowski G., Bass K.E., Venkatraman S., Percival M.D. (2004) An activity-based probe for the determination of cysteine cathepsin protease activities in whole cells. *Anal. Biochem.* **335**, 218-227
- ¹⁶¹ Greenbaum D., Medzihradszky K.F., Burlingame A., Bogoy M. (2000) Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling discovery tools. *Chem. Biol.* **7**, 569-581
- ¹⁶² Speers A.E., Cravatt B.F. (2004) Chemical strategies for activity-based proteomics. *ChemBioChem.* **5**, 41-47
- ¹⁶³ Adams G.C., Sorensen E.J., Cravatt B.F. (2002) Chemical strategies for functional proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 781-790

- ¹⁶⁴ Fonović M., Bogyo M. (2008) Activity-based probe as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert Rev. Proteomics* **5**, 721-730
- ¹⁶⁵ Jiyoun L., Bogyo M. (2009) Development of Near-Infrared Fluorophore (NIRF)-labeled activity-based probes for *in vivo* imaging of legumain. *Chem. Biol.* **5**, 233-243
- ¹⁶⁶ Fleet G.W.J., Porter R.R., Knowles J.R. (1969) Affinity labelling of antibodies with aryl nitrene as reactive group. *Nature* **224**, 511-512
- ¹⁶⁷ Smith R.A.G., Knowles J.R. (1973) Aryldiazirines. Potential reagents for photolabeling of biological receptor sites. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5072-5073
- ¹⁶⁸ Hatanaka Y., Sadakane Y. (2002) Photoaffinity labelling in drug discovery and developments : Chemical gateway for entering proteomic frontier. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 271-288
- ¹⁶⁹ Fleming S.A. (1995) Chemical reagents in photoaffinity labeling. *Tetrahedron* **51**, 12479-12520
- ¹⁷⁰ Dormán G., Prestwich G.D. (2000) Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.* **18**, 64-77
- ¹⁷¹ Geurink P.P., Prely L.M., van der Marel G.A., Bischoff R., Overkleeft H.S. (2012) Photoaffinity labeling in activity-based protein profiling. *Top. Curr. Chem.* **324**, 85-113
- ¹⁷² Dormán G., Prestwich G.D. (1994) Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* **33**, 5661-5673
- ¹⁷³ Wittelsberger A., Thomas B.E., Mierker D.F., Rosenblatt M. (2006) Methionine acts as a “magnet” in photoaffinity crosslinking experiments. *FEBS Letters* **580**, 1872-1876
- ¹⁷⁴ Garcia G., Chiara D.C., Nirthanan S., Hamouda A.K., Stewart D.S., Cohen J.B. (2007) [³H]Benzophenone photolabeling identifies state-dependent changes in nicotinic acetylcholine receptor structure. *Biochemistry* **46**, 10296-10307
- ¹⁷⁵ Saghatelian A., Jessani N., Joseph A., Humphrey M., Cravatt B.F. (2004) Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10000-10005.
- ¹⁷⁶ Sieber S.A., Niessen S., Hoover H.S., Cravatt B.F. (2006) Proteomic profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 274-281
- ¹⁷⁷ Wang J., Uttamchandani M., Li J., Hu M., Yao S.Q. (2006) “Click” synthesis of small molecule probes for activity-based fingerprinting of matrix metalloproteases *Chem. Comm.* **28**, 3783-3785
- ¹⁷⁸ Blanton M.P., Cohen J.B. (1994) Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: Secondary structure implications. *Biochemistry* **33**, 2859-2872

- ¹⁷⁹ Blanton M.P., Cohen J.B. (1992) Mapping the lipid-exposed regions in the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **31**, 3738-3750
- ¹⁸⁰ Chan E.W., Chattopadhyaya S., Panicker R.C., Huang X., Yao S.Q. (2004) Developing photoactive affinity probes for proteomic profiling: Hydroxamate-based probes for metalloproteases. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14435-14446
- ¹⁸¹ Leeuwenburgh M.A., Geurink P.P., Klein T., Kauffman H.F., van der Marel G.A., Bischoff R., Overkleeft H.S. (2006) Solid-phase synthesis of succinylhydroxamate peptides: Functionalized matrix metalloproteinase inhibitors. *Org. Lett.* **8**, 1705-1708
- ¹⁸² Geurink P.P., Klein T., Prely L., Paal K., Leeuwenburgh M.A., van der Marel G.A., Kauffman H.F., Overkleeft H.S., Bischoff R. (2010) Design of peptide hydroxamate-based photoreactive activity-based probes of zinc-dependent metalloproteases. *Eur. J. Org. Chem.* **11**, 2100-2112
- ¹⁸³ Qiu W., Xu J., Li X., Zhong L., Li J., Li J., Nan F. (2009) Design and synthesis of matrix metalloprotease photoaffinity trimodular probes. *Chin. J. Chem.* **27**, 825-833
- ¹⁸⁴ Lenger J., Kaschani F., Lenz T., Dalhoff C., Villamor J.G., Köster H., Sewald N., van der Hoorn R.L. (2012) Labeling and enrichment of *Arabidopsis thaliana* matrix metalloproteases using active-site directed, marimastat-based photoreactive probe. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 592-596
- ¹⁸⁵ Johnson J.L., Devel L., Czarny B., George S.J., Jackson C.L., Rogakos V., Beau F., Yiotakis A., Newby A.C., Dive V. (2011) A selective matrix metalloproteinase-12 inhibitor retards atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 528-535
- ¹⁸⁶ David A., Steer D., Bregant S., Devel L., Makritsis A., Beau F., Yiotakis A., Dive V. (2007) Cross-linking yield variation of a potent matrix metalloproteinase photoaffinity probe and consequences for functional proteomics. *Angew. Chem. Int.* **46**, 3275-3277
- ¹⁸⁷ Dabert-Gay A.S., Czarny B., Devel L., Beau F., Lajeunesse E., Bregant S., Thai R., Yiotakis A., Dive V. (2008) Molecular determinants of matrix metalloproteinase-12 covalent modification by a photoaffinity probe: insights into activity-based probe development and conformational variability of matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **283**, 31058-31067
- ¹⁸⁸ Dabert-Gay A.S., Czarny B., Lajeunesse E., Thai R., Nagase H., Dive V. (2009) Covalent modification of matrix metalloproteinases by a photoaffinity probe: Influence of nucleophilicity and flexibility of the residue in position 241. *Bioconjug. Chem.* **20**, 367-375
- ¹⁸⁹ Jullien N., Makritsis A., Georgiadis D., Beau F., Yiotakis A., Dive V. (2010) Phosphinic Tripeptides as Dual Angiotensin-Converting Enzyme C-Domain and Endothelin-Converting Enzyme-1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **53**, 208-220

- ¹⁹⁰ Makaritis A., Georgiadis D., Dive V., Yiotakis A. (2003) Diastereoselective solution and multipin-based combinatorial array synthesis of a novel class of potent phosphinic metalloprotease inhibitors. *Chem. Eur. J.* **9**, 2079-2094
- ¹⁹¹ Horovitz A., Levitzki A. (1987) An accurate method for determination of receptor-ligand and enzyme-inhibitor dissociation constants from displacement curves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **84**, 6654-6658
- ¹⁹² Chang C.C., Chen C.Y., Chiu H.F., Dai S.X., Liu M.Y., Yang C.Y. (2011) Elastases from inflammatory and dendritic cells mediate ultrafine carbon black induced acute lung destruction in mice. *Inhal. Toxicol.* **23**, 616-626
- ¹⁹³ Didangelos A., Yin X., Mandal K., Saje A., Smith A., Xu Q., Jahangiri M., Mayr M. (2011) Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, 8
- ¹⁹⁴ Didangelos A., Yin X., Mandal K., Baumert M., Jahangiri M., Mayr M. (2010) Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 9
- ¹⁹⁵ Cobos-Correa A., Trojanek J.B., Diemer S., Mall M.A., Schultz C. (2009) Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 628-630.
- ¹⁹⁶ Moellering R.E., Cravatt B.F. (2012) How chemoproteomics can enable drug discovery and development. *Chemistry & Biology* **19**, 11-22
- ¹⁹⁷ Ran C., Zhang Z., Hooker J., Moore A. (2012) *In Vivo* photoactivation without "light": Use of Cherenkov radiation to overcome the penetration limit of light. *Mol. Imaging Biol.* **14**, 156-162
- ¹⁹⁸ Barthe N. (2007) L'imagerie bêta haute résolution. *Médecine Nucléaire* **31**, 193-201
- ¹⁹⁹ Horo D.W., Hubbs A.F., Mercer R.R., Wu N., Wolfarth M.G., Sriram K., Leonard S., Battelli L., Schwegler-Berry D., Friend S., Andrew M., Chen B.T., Tsuruoka S., Endo M., Castranova V. (2010) Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology* **269**, 136-147

Résumé

Le développement d'une nouvelle sonde dite « activity-based probe » pour réaliser la détection de formes actives de protéases appartenant à la famille des protéases à zinc de la matrice (MMP) a été réalisé dans ce travail, en partant d'un inhibiteur phosphinique puissant des MMP dans lequel a été introduit un groupement photoactivable de type diazérine. Ce composé se révèle un inhibiteur puissant de plusieurs MMP avec des affinités nanomolaires. Ce composé incubé avec différentes MMP est par ailleurs capable de modifier de façon covalente un grand nombre de MMP au niveau de leur site actif, avec des rendements de modification variant de plus de 50% à 11%, selon la nature des MMP. En ayant choisi comme moyen de détection la radioactivité, nous démontrons qu'avec cette nouvelle sonde qu'il est possible de détecter des formes actives de MMP avec des sensibilités de l'ordre de la femtomole dans des systèmes modèles de protéomes complexes. Appliquée à l'analyse de lavages broncho alvéolaires de souris traitées par voie pulmonaire avec des nanoparticules pour induire une réponse inflammatoire, cette nouvelle sonde permet de mettre en évidence la présence de formes actives du domaine catalytique de la MMP-12, une métalloprotéase à zinc exprimée par les macrophages, mais pas dans les animaux contrôles. En revanche l'analyse de carotides humaines de patients souffrant d'athérosclérose ne nous pas conduit avec cette sonde à la détection de formes actives de MMP. Malgré ce résultat, il est à noter que la détection de forme active de MMP dans un fluide pathologique est une première dans ce domaine. Cette sonde étant validée pour sa capacité à détecter des formes actives de MMP, elle permettra dans l'avenir de tester d'autres fluides pathologiques d'origine humaine ou bien des extraits de tissu comme des tumeurs pour lesquels les MMP pourraient être des marqueurs de ces pathologies.

Abstract

A new activity-based probe able to covalently modify the active site of proteases belonging to the matrix metalloprotease family (MMPs) has been developed in this thesis project. The probe was shown to behave as potent inhibitor of several MMPs, with nanomolar K_i values. This probe was also able to modify specifically only the free active site of MMPs, with particular high yields of cross-linking varying from 50 % to 11 %, depending of the MMPs tested. Using radioactivity as means of detection, this probe was able to detect active form of MMPs with a threshold of 1 femtomole. Applied to the study of bronchoalveolar fluids (BAL) from mice exposed to nanoparticles by a lung aspiration protocol, this probe revealed the presence of the catalytic domain of MMP-12 under its active form, but not in control animals. When used to detect active form of MMPs from extracts obtained from human arteries of patient suffering from atherosclerosis, the probe was not able to detect such MMP active forms. Despite this negative result, the detection of active form of MMP in pathological fluid like BAL has never been reported before this work. Having validated this novel MMP activity-based probe, it will be possible to use it now for detecting MMPs from other pathological fluids or tissues extracts in which MMPs can be good markers of the pathology.